

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

***Exserohilum turcicum* EM MILHO:**
CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E
PATOLÓGICA, ASSOCIAÇÃO A SEMENTES E
SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS

ROBERTO LUIS DE ROSSI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia - Área de Concentração em Fitopatologia.

Passo Fundo, novembro de 2012.

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

***Exserohilum turcicum* EM MILHO:**
CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E
PATOLÓGICA, ASSOCIAÇÃO A SEMENTES E
SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS

ROBERTO LUIS DE ROSSI

Orientador: Prof. Dr. Erlei Melo Reis

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia - Área de Concentração em Fitopatologia.

Passo Fundo, novembro de 2012



FAMV - Faculdade de
Agronomia e Medicina Veterinária
PPGAgro - Agronomia



A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação.

“*Exserohilum turcicum* em milho: caracterização morfológica e
patológica, associação a sementes e sensibilidade a fungicidas”

Elaborada por

Roberto Luis De Rossi

Como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em
Agronomia – Área de Fitopatologia

Aprovada em: 21/11/2012
Pela Comissão Examinadora

Dr. Erlei Melo Reis
Presidente da Comissão Examinadora
Orientador

Dra. Simone Meredith Scheffer Basso
Coord. Prog. Pós-Graduação em Agronomia

Dr. Ricardo Trezzi Casa
UESC

Dr. Hélio Carlos Rocha
Diretor FAMV

Dr. José Otávio Menten
ESALQ

CIP – Catalogação na Publicação

R833e De Rossi, Roberto Luis
Exserohilum turcicum em milho : caracterização
morfológica e patológica, associação a sementes e
sensibilidade a fungicidas / Roberto Luis De Rossi. - 2012.
151 f.: il., color. ; 25 cm.

Dissertação (Mestrado em Agronomia)
Orientador: Prof. Dr. Erlei Melo Reis
Universidade de Passo Fundo, 2012.

1. Plantas - Efeito dos fungicidas. 2. Fitopatologia.
3. Milho - Sementes. I. Reis, Erlei Melo, orientador.
- II. Título.

CDU: 632.952

Catalogação: Bibliotecária Jucelei Rodrigues Domingues - CRB 10/1569

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo o que tenho e pela constante presença.

A minha esposa, Evangelina pelo amor, incentivo, paciência,
compreensão e entusiasmo.

Aos meus pais, Roberto e Marisa, pelo exemplo de pessoas, pela
incansável dedicação, força, apoio e acima de tudo pelo amor.

Aos meus irmãos Sol, Cari, Pachi e Juan pela sua presença em todos os
momentos da minha vida.

Ao meus amigos e colegas da Universidade Católica de Córdoba,
Cristina, Elsa, Fernando, Pamela, Andrea, Nathalie, Marina, Daniel, e
em especial ao Gustavo Guerra, pela confiança, suporte, ensinamentos
e amizade.

Ao meu Orientador, Dr. Erlei Melo Reis, pela orientação, incentivo,
palavras positivas e pela amizade.

Ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia, professores e
funcionários, pelo auxílio e dedicação.

Aos professores convidados para a banca examinadora: professor Dr.
Ricardo Trezzi Casa e professor Dr. José Menten.

À Cinara Cardoso e ao Paulo Tironi,
pela colaboração no trabalho e pela amizade.

Aos principais colaboradores ao desenvolvimento deste trabalho:
Ricardo Brustolin, Felipe Dalavechia, Lucas Pedron, Gian Beledelli,
Eder Junior.

Às grandes amizades decorrentes do curso de Pós-Graduação, Ricardo
Brustolin, Leandra Leite, Eduardo Viana, Anderson Danelli, Cristina
Boaretto, Aveline Avozani, Rosane Tonin, Sandra M. Zoldan, Camila

Ranzi, Juliane N. Camera, Lilian Cerbaro, Camila Turra, Bruna Pollo,
Jônata Galvan, Leandro Costa, Wanessa Escopel, Elaine Deuner,
Lucas Zernielli, Rafael Roehrig, Ivan Tedesco, Julio Franz, Laercio
Hoffman e Mari Vieselli.

A todas as pessoas que ou pela amizade ou pela dedicação, contribuem
à minha formação profissional e pessoal.

MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

	Página
SUMÁRIO	vii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
RESUMO	01
ABSTRACT	03
1 INTRODUÇÃO	06
2 REVISÃO DE LITERATURA	07
2.1 O milho.....	07
2.2 A produção do milho na Argentina e no Brasil.....	09
2.3 A Helmintosporiose do milho.....	11
2.3.1 Historia.....	11
2.3.2 Sintomatologia.....	12
2.3.3 Ocorrência e distribuição.....	14
2.3.4 Danos e perdas.....	15
2.3.5 Etiologia e taxonomia.....	19
2.3.6 Meios de cultura.....	23
2.3.7 Epidemiologia - Ciclo da doença.....	24
2.3.7.1 Condições ambientais predisponentes.....	24
2.3.7.2 Infecção.....	27
2.3.7.3 Sobrevivência	28
2.3.7.4 Hospedeiros.....	30
2.3.7.5 Disseminação.....	31
2.3.8 Manejo.....	33
2.3.8.1 Raças-Resistência-Fontes de resistência.....	33
2.3.8.2 Toxinas e enzimas.....	36
2.3.8.3 Fungitoxicidade de fungicidas <i>in vitro</i>	38
2.3.8.4 Fungicidas a campo.....	39
2.3.8.5 Controle biológico.....	40
2.3.9 Manejo integrado.....	41
 CAPÍTULO I	
Morfologia de conídios e patogenicidade em milho, de isolados de <i>Exserohilum turcicum</i> da Argentina e do Brasil	
RESUMO	43
ABSTRACT	45
1 INTRODUÇÃO	47

2 MATERIAL E MÉTODOS	48
2.1 Identificação e caracterização	49
2.2 Prova de patogenicidade.....	52
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
3.1 Identificação e caracterização	55
3.2 Patogenicidade.....	60
4 CONCLUSÕES	64

CAPÍTULO II

Meio semi-seletivo para a detecção de *Exserohilum turcicum* em sementes de milho

RESUMO	65
ABSTRACT	66
1 INTRODUÇÃO	68
2 MATERIAL E MÉTODOS	71
2.1 Obtenção de meio semi-seletivo.....	71
2.2 Detecção e quantificação da infecção natural de <i>Et</i> em sementes de milho e de milho-pipoca.....	75
2.3 Detecção e quantificação da infestação de <i>Et</i> em sementes de milho.....	80
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
3.1 Obtenção de meio semi-seletivo	82
3.2 Detecção e quantificação da infecção natural de <i>Et</i> em sementes de milho e milho-pipoca.....	84
3.3 Detecção e quantificação da infestação de <i>Et</i> em sementes de milho.....	91
4 CONCLUSÕES	93

CAPÍTULO III

Quantificação da transmissão de *Exserohilum turcicum* de sementes para órgãos aéreos do milho

RESUMO	94
ABSTRACT	95
1 INTRODUÇÃO	97
2 MATERIAL E MÉTODOS	99
2.1.1.2 Infecção das sementes: método de exposição direta.....	100
2.1.1.3 Infecção das sementes: método da imersão na suspensão de conídios.....	101
2.2 Determinação da infecção.....	101

2.3 Determinação da transmissão.....	101
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	103
3.1 Infecção: método de exposição direta.....	103
3.2 Infecção:método da imersão na suspensão de conídios..	106
4 CONCLUSÕES.....	108

CAPÍTULO IV

Sensibilidade miceliana *in vitro* de *Exserohilum turcicum* a fungicidas

RESUMO.....	109
ABSTRACT.....	110
1 INTRODUÇÃO.....	112
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	113
2.1 Isolados de <i>Et</i>	113
2.2 Fungicidas.....	114
2.3 Determinação <i>in vitro</i> da sensibilidade micelial a fungicidas.....	115
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	117
4 CONCLUSÕES.....	127
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	128

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
CAPÍTULO I		
1	Identificação dos isolados monospóricos de <i>Et</i> , de milho.....	51
2	Caracterização morfológica de conídios de isolados monospóricos de <i>Et</i> obtidos de híbridos de milho coletados na Argentina e no Brasil.....	57
3	Características morfológicas de conídios de <i>Et</i> segundo vários autores.....	59
4	Comparação das características morfológica de conídios de <i>Et</i> obtidos da Argentina e do Brasil.....	59
5	Lesões por folha, comprimento, largura e severidade estimada dos sintomas causados pela inoculação de dez isolados monospóricos de <i>Et</i> em folhas de milho.....	63
CAPÍTULO II		
1	Incidência (%) e germinação (%) de <i>Et</i> inoculado em sementes inoculadas artificialmente de dois híbridos de milho em três meios semi-seletivos.....	83
2	Incidência (%) da infecção natural de <i>Et</i> em sementes de milho e milho-pipoca em cinco métodos de detecção.....	86
3	Infestação de sementes de milho P1630, com conídios de <i>Et</i>	91
CAPÍTULO III		
1	Germinação (%), infecção artificial (%) e transmissão (%) de sementes de milho e milho pipoca infectadas artificialmente com <i>Et</i> pelo método da exposição direta sobre micelio.....	105
2	Infecção de sementes de milho com	

	quatro concentrações de conídios/mL de <i>Et</i>	107
3	Germinação (%), infecção (%) e transmissão (%) de sementes de milho e de milho-pipoca infectadas artificialmente com <i>Et</i> pela imersão em suspensão de conídios.....	107

CAPÍTULO IV

1	Identificação dos isolados monospóricos de <i>Et</i> , de milho.....	114
2	Isolados, equação, coeficiente de determinação (r^2), concentração inibitória de 50% do crescimento miceliano (CI_{50}), classificação da sensibilidade, de <i>Et</i> para o fungicida carbendazim.....	121
3	Isolados, equação, coeficiente de determinação (r^2), concentração inibitória de 50% do crescimento miceliano (CI_{50}), classificação da sensibilidade, de <i>Et</i> para o fungicida metalaxil.....	121
4	Isolados, equação, coeficiente de determinação (r^2), concentração inibitória de 50% do crescimento miceliano (CI_{50}), classificação da sensibilidade, de <i>Et</i> para o fungicida captana.....	122
5	Isolados, equação, coeficiente de determinação (r^2), concentração inibitória de 50% do crescimento miceliano (CI_{50}), classificação da sensibilidade de, <i>Et</i> para o fungicida tiram.....	122
6	Isolados, equação, coeficiente de determinação (r^2), concentração inibitória de 50% do crescimento miceliano (CI_{50}), classificação da sensibilidade, de <i>Et</i> para o fungicida	123

	fludioxonil.....	
7	Isolados, equação, coeficiente de determinação (r^2), concentração inibitória de 50% do crescimento miceliano (CI_{50}), classificação da sensibilidades, de <i>Et</i> para o fungicida iprodiona.....	123
8	Concentração inibitória de 50% do crescimento miceliano (CI_{50}) de fungicidas para isolados <i>Et</i>	124

LISTA DE FIGURAS

Figuras		Página
REVISÃO DE LITERATURA		
1	Sintomas de <i>Et</i> : a) iniciais e b) avançados.....	13
2	Diferentes sintomas <i>Et</i> , dependendo da reação do cultivar: suscetível (a); diferentes reações de hipersensibilidade (b) e (c).....	14
3	a) Conídios e conidióforo de <i>Et</i> , b) ascas, ascosporos e peritécio de <i>Trichometasphaeria túrcica</i>	22
4	a) Conídio, b) conidióforos, c) clamidósporos de <i>Et</i>	22
5	Ciclo da helmintosporiose do milho.....	27
CAPÍTULO I		
1	Estruturas de <i>Et</i> : a) conídio do isolado 02-BR, b) conídios e conidióforo do isolado 03-AR.....	60
2	Sintomas de <i>Et</i> : a) lesão de uma semana, b) lesão as duas semanas da inoculação.....	62

CAPÍTULO II

1	(a) semente com micélio e conídios, (b) conídios (c) lesões foliares de <i>Et</i> isolado de sementes de milho.....	93
---	---	----

CAPÍTULO III

1	Incidência de <i>Et</i> em sementes de milho infectadas artificialmente pelo método de exposição direta sobre micélio. a) testemunha b) semente infectada artificialmente (micélio escuro de <i>Et</i>).....	104
2	Sintomas em plântulas de milho a partir de sementes inoculadas com <i>Et</i> . a, b, c, d, e: crescendo em caixas com solo turfoso; f: crescendo em tubos de ensaio com areia.....	106

CAPÍTULO IV

1	Inibição do crescimento miceliano de <i>Et</i> , in vitro, media de dez isolados, em seis concentrações.....	125
2	Crescimento miceliano <i>Et</i> em meios de cultura suplementados com sete concentrações de fungicidas.....	126

***Exserohilum turcicum* EM MILHO:
CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E
PATOLÓGICA, ASSOCIAÇÃO A SEMENTES E
SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS**

ROBERTO LUIS DE ROSSI¹

RESUMO - A helmintosporiose do milho, causada pelo fungo *Exserohilum turcicum* (*Et*), tornou-se uma doença importante em regiões da Argentina e do Brasil, em especial naquelas com ambiente favorável à doença. Muitas empresas produtoras de sementes de milho trabalham em ambos os países e geralmente existe intercâmbio de material genético visando selecionar híbridos melhor adaptados a cada região produtora. Devido a esse fato, é fundamental a disponibilidade de informação sob o patossistema para direcionar estratégias de manejo. Os objetivos deste trabalho foram: (i) comparar as características morfológicas dos conídios de *Et*, sua patogenicidade em híbrido de milho, de isolados da Argentina e do Brasil; (ii) desenvolver um método de detecção do fungo e quantificar sua presença infectando e/ou infestando sementes de milho e milho pipoca; (iii) identificar metodologia para a inoculação artificial de sementes de milho com *Et* e utilizar as sementes infectadas para descrever e quantificar o processo de transmissão do fungo da semente para os órgãos aéreos, (iv) determinar a sensibilidade miceliana de dez isolados de *Et*, cinco da Argentina e cinco do Brasil, a seis fungicidas utilizados em

¹ Engenheiro Agrônomo, mestrando do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de Concentração em Fitopatologia.

tratamentos de sementes. Os ensaios foram desenvolvidos na Universidade de Passo Fundo durante os anos 2011 e 2012. Foram mensurados e caracterizados 200 conídios de cada isolado. Na comprovação da patogenicidade, plantas de milho do híbrido P1630 foram inoculadas com a deposição de uma suspensão de conídios de *Et* no cartucho e decorridas duas semanas, quantificou-se o número de lesões/folha e a mensuração das lesões. Foram testados distintos meios e métodos de detecção do patógeno em sementes utilizando-se sementes infectadas artificialmente. O método mais sensível foi utilizadas em sementes comerciais infectadas e infestadas naturalmente com *Et*. Foram testados diferentes métodos de inoculação de sementes, e avaliada a incidência de *Et* e a germinação das sementes para descrever a transmissão aos órgãos aéreos. A sensibilidade miceliana foi realizada *in vitro* utilizando placas de petri com meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) suplementado com fungicidas nas concentrações de 0; 0,01; 0,1; 1; 10; 25 e 50 mg/L. Na média, os conídios mediram 10-25 x 30-135 µm, apresentando 2-8 septos; e coincidiram com as registradas na literatura. Os dez isolados produziram uma média de 2,5 lesões/folha, não observando-se diferenças significativas na patogenicidade dos dez isolados. Foi obtido um meio semi-seletivo composto de: i) sulfato de estreptomicina 500 mg/L, ii) sulfato de neomicina 600 mg/L iii) carbendazim 60 mg/L, e iv) captana 30 mg/L, agregados ao meio de lactose caseína hidrolisada ágar (LCHA). Com o meio semi-seletivo detectou-se o fungo em sementes de milho infectadas naturalmente com 0,124% de incidência (media de dez amostras) e determinou-se também a infestação de semente de milho, com 1,04 conídios por

semente. Não foi possível detectar o fungo em órgãos aéreos a partir de sementes infectadas. Foi possível obter infecção artificial das sementes de milho com *Et* pela exposição da semente ao micélio do fungo. O principio ativo iprodiona foi o mais potente para o controle de *Et*, seguido pelo fludioxonil e tiram. Os fungicidas carbendazim, metalaxil e captana foram classificados como não fungitóxicos a *Et*. Os resultados obtidos neste trabalho, quanto a CI₅₀, podem ser utilizados como valores de referência para próximos estudos.

Palavras-chave: helmintosporiose, *Zea mays*, *Helminthosporium turcicum*, sanidade de sementes, fungicida

***Exserohilum turcicum* IN CORN: MORPHOLOGICAL AND PATHOLOGICAL CHARACTERIZATION, SEEDS ASSOCIATION AND FUNGICIDE SENSIBILITY**

ABSTRACT - The northern corn leaf blotch, caused by the fungus *Exserohilum turcicum* (*Et*), has become an important disease in parts of Argentina and Brazil, in particular those with environment favorable for disease. Many companies conduct corn seed work in both countries, and there is usually exchange of genetic material in order to select hybrids better adapted to each region. Because of this, it is essential the availability of information in the pathosystem to guide management strategies. The objectives of this study were to: (i) compare the morphological characteristics of *Et* conidia, its

pathogenicity in hybrid corn, isolated from Argentina and Brazil, (ii) develop a sensitive method for detection and quantification of the fungus infecting/infesting seed corn and popcorn, (iii) identify methodology for artificial seed corn inoculation and utilize the infected seeds to describe and quantify the transmission process from seeds to aerial organs, (iv) determine the mycelial sensitivity of *Et* ten isolates, five from Argentina and five in Brazil, six fungicides used in seed treatments. The tests were performed at the University of Passo Fundo during the years 2011 and 2012. Were measured and characterized 200 spores of each isolate. To confirm the fungus pathogenicity, corn plants were inoculated with the deposition of a conidia suspension of *Et* in the whorl and after two weeks quantified the number of lesions/leaf and the measured lesion length. We tested different media/methods for detection of pathogen in seeds using artificially infected seeds. The most sensitive method was used in commercial seed naturally infected and infested with *Et*. We tested different methods of seed inoculation and assessed the incidence of *Et* and germination and to describe the transmission to the aerial organs. The sensitivity mycelium was performed *in vitro* using petri dishes with culture medium potato dextrose agar (PDA) supplemented with concentrations of 0, 0.01, 0.1, 1, 10, 25 and 50 mg/L. On the average conidia measured 10-25 x 30-135 μm , with 2-8 septa, the measured characteristics matched those reported in the literature. The ten isolates produced an average of 2.5 lesions/leaf, was not seen significant differences in pathogenicity among the ten isolates. A semi-selective medium consisting of: i) streptomycin sulfate 500 mg/L, ii) neomycin sulfate 600 mg/L iii) carbendazim 60 mg/L, and iv) captan 30 mg/L,

added to the medium lactose hydrolysed casein agar (LCHA) was selected. With the semi-selective medium *Et* fungus was detected in corn seeds naturally infected with 0.124% incidence. It was also determined and corn seed infestation with 1.04 conidia/seed. Although it was not possible to detect the fungus transmission to aerial organs from seeds, it was succeeded in artificially infected seed corn with *Et* by exposing the seed to the mycelium of the fungus. The active ingredient iprodione was the most powerful to control *Et*, followed by fludioxonil and thiram. The fungicides carbendazim, metalaxyl and captan were classified as non-fungitoxic the *Et*. The IC₅₀ values, may be used as reference values for future studies.

Key-words: Northern leaf blight, *Zea mays*, *helminthosporium*, seed assay, fungicide

1. INTRODUÇÃO

O milho, *Zea mays* L., é um dos grãos alimentares mais antigos sendo considerado como uma das cinco principais culturas de cereais no mundo, juntamente com arroz, trigo, cevada e sorgo (FAO, 2012).

O Brasil produziu 56,3 milhões de toneladas de milho na safra 2011-2012, e exportou 8,5 milhões de toneladas. A Argentina, na mesma safra, produziu 20,3 milhões de toneladas de milho, e exportou 14,5 milhões de toneladas (FAO/GIEWS, 2012).

A cultura do milho é afetada por diversas doenças foliares, as quais podem causar danos significativos no rendimento e na qualidade dos grãos. Dentro delas a helmintosporiose do milho causada por *Exserohilum turcicum* Leonard & Suggs (sinom. *Helminthosporium turcicum* Pass) [teleomorfo *Setosphaeria turcica* (Lutterell); sinon. *Trichometasphaeria turcica* Lutterell Leonard & Suggs)] é uma das principais doenças foliares do milho (FREDERIKSEN, 1991). Pode causar redução da área foliar sadia durante o período de enchimento dos grãos resultando em danos de 50% ou mais em cultivares suscetíveis (PERKINS & PEDERSEN, 1987).

O milho é intensamente cultivado na Argentina e no Brasil. Muitas empresas produtoras de sementes de milho trabalham em ambos os países e geralmente, existe intercâmbio de material genético visando obter melhores híbridos comerciais adaptados a cada área produtora. A experiência de outros países que convivem com este patossistema é de fundamental importância, mas é preciso obter informação regional para direcionar estratégias de manejo de acordo com os diferentes sistemas de produção. Desta forma, os objetivos

deste trabalho foram: (i) comparar as características morfológicas dos conídios e suas patogenicidades em híbrido de milho, de isolados de *Et* obtidos da Argentina e do Brasil; (ii) desenvolver um método de detecção do fungo, e quantificar sua presença infectando e/ou infestando sementes de milho e milho pipoca; (iii) identificar metodologia para a inoculação artificial de sementes de milho com *Et* e utilizar as sementes infectadas para descrever e quantificar o processo de transmissão do inóculo da semente para os órgãos aéreos; (iv) determinar a sensibilidade miceliana de dez isolados de *Et*, cinco da Argentina e cinco do Brasil, a seis fungicidas utilizados para tratamentos de sementes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O milho

O milho, *Zea mays* (L.), é um dos grãos alimentares mais antigos e mais conhecidos. Pertence à família das Poaceae (gramíneas), tribo Maydeae, e é a única espécie cultivada do gênero. Outras espécies do gênero *Zea*, comumente chamada teosinto, e espécies do gênero *Tripsacum* conhecido como arrocinho ou maicinho, parentes selvagens, são formas de *Zea mays*. São classificados como do Novo Mundo, pois seu centro de origem está na América (PALIWALL et al., 2001).

Inicialmente, os taxonomistas classificaram os gêneros *Zea* e *Euchlaena*, ao qual pertence o teosinto, como dois gêneros distintos. Com base na compatibilidade para a hibridação entre estes grupos de

plantas e estudos citogenéticos, é aceito que ambos pertencem ao gênero *Zea* (REEVES & MANGELSDORF, 1942).

O teosinto e *Tripsacum* são importantes como possíveis fontes de características desejáveis para o melhoramento do milho. O *Tripsacum* não tem valor econômico direto, enquanto o teosinto tem algum valor como forragem (PALIWALL et al., 2001).

O milho é conhecido por vários nomes comuns, o mais utilizado em países anglófonos é maize, exceto nos Estados Unidos e Canadá, onde é chamado corn. Em espanhol é chamado de maíz, em Francês maïs, em Português milho, e no subcontinente indiano é conhecido como mkka ou makki (PALIWALL et al., 2001).

O milho cultivado é uma planta completamente domesticada e o homem e o milho evoluíram juntos desde os tempos antigos. O milho não cresce em estado selvagem e não pode sobreviver na natureza, sendo totalmente dependente dos cuidados humanos (WILKES, 1985; GALINAT, 1988; DOWSWELL et al., 1996).

Geralmente se considera que o milho foi uma das primeiras plantas cultivadas pelos agricultores entre 7.000 e 10.000 anos atrás. A mais antiga evidência de milho como alimento, vem de alguns sítios arqueológicos, no México, onde algumas pequenas espigas de milho, de mais de 5.000 anos estimados, foram encontradas em cavernas de povos primitivos (WILKES, 1979, 1985).

Muitos pesquisadores acreditam que o milho teria sido originado no México, onde ele e o teosinto coexistiram desde os tempos antigos e onde ambas as espécies possuem uma diversidade ampla (WHEATHERWAX, 1955; ILTIS, 1983; GALINAT, 1988; WILKES, 1989). A descoberta de fósseis de pólen e de espigas de

milho em cavernas arqueológicas apóiam fortemente a posição de que o milho se originou no México (PALIWALL et al., 2001).

O debate sobre a origem do milho ainda está em curso e entender este problema, não é apenas de interesse acadêmico. É importante para promover programas de melhoramento visando a transferência de características desejáveis de parentes selvagens e criolos no melhoramento contínuo do milho (PALIWALL et al., 2001).

A difusão do milho a partir de seu centro de origem, no México, para várias partes do mundo foi tão notável e rápida como sua evolução a planta cultivada e produtiva de alimentos. Os habitantes de várias tribos indígenas da América Central e do México levaram esta planta para outras partes da América Latina, do Caribe, e depois para os Estados Unidos e Canadá. Exploradores europeus levaram o milho para a Europa e, em seguida, os comerciantes o levaram para Ásia e África (PALIWALL et al., 2001).

O milho é uma cultura que deve ser devidamente explorada para alimentar a crescente população mundial. Aumentos na produção de alimentos e rações para animais devem ser provenientes de grãos, incluindo o milho, que têm vantagens comparativas de cultivo em ambientes desfavoráveis (PALIWALL et al., 2001).

2.2 A produção do milho na Argentina e no Brasil

O milho é um das tres principais culturas de cereais no mundo, juntamente com o arroz e o trigo. Além de ser básico para consumo humano, o milho é utilizado para a alimentação animal e, recentemente, como bio ou agro combustível (FAO, 2012).

O Brasil produziu 56,3 milhões de toneladas de milho na safra 2011-2012, e exportou 8,5 milhões de toneladas. A Argentina, na mesma safra, produziu 20,3 milhões de toneladas de milho, e exportou 14,5 milhões de toneladas (FAO/GIEWS, 2012).

Com essas produções, Brasil e Argentina, posicionaram-se como o terceiro e o quarto país de maiores produções de milho no mundo, só atrás dos Estados Unidos e da China. A produção de Brasil representa 7% da produção de mundial milho, e a Argentina o 3% (USDA-FAS, 2012).

Quanto às exportações, a Argentina exportou 14,5 milhões de toneladas, ficando como o segundo exportador mundial, o que representa o 18,5% das exportações mundiais do milho, só superado pelos Estados Unidos. O Brasil é o quarto exportador com 8,5 milhões de toneladas de milho, o que representa o 9% das exportações mundiais (USDA-FAS, 2012).

Segundo o Ministério da Agricultura, Gado e Pesca de Argentina (MAGyP) na safra 2010-2011 foram semeadas 3,1 milhões de hectares de milho, com uma produtividade de 6,1 tonelada por hectare. Segundo o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento do Brasil (MAPA) na mesma safra foram semeadas 12,9 milhões de hectares, com uma produtividade de 4,2 toneladas por hectare.

2.3 A Helmintosporiose do milho

2.3.1 História

Esta doença recebe o nome comum de helmintosporiose por ter como agente causal o fungo que pertencia ao Gênero *Helminthosporium* Linl (SHOEMAKER, 1959; SIVANESAN, 1987; ALCORN, 1988; MUCHOVEJ et. al., 1988).

A doença foi primeiramente relatada por Passerini em milho (*Zea mays* L.), na Itália em 1876 (FERNANDEZ VALIELLA, 1969; JORDAN et al., 1983). Posteriormente, foi adquirindo maior difusão em diversos países da Europa, África, Austrália e América (FERNANDEZ VALIELLA, 1969).

Os primeiros relatos da helmintosporiose do milho, causada pelo fungo *Helminthosporium turcicum* Pass., foram feitos por Passerini, em Perna, Itália, no ano 1876. Posteriormente, Pammel et al. (1910) e Drechsler (1923), consideraram o patógeno como *Trichometasphaeria turcica* Luttrell.

Após, Leonard & Suggs (1974) estabeleceram o gênero *Exserohilum* para as espécies de *Helminthosporium* em que o hilo dos conídios é fortemente saliente. O nome hoje aceito é *E. turcicum* (Pass.) Leonard Suggs. Além disso, um novo gênero de ascomiceto, *Setosphaeria*, foi proposto para acomodar o teleomorfo, anteriormente classificados como *Keissleriella* ou *Trichometasphaeria* (ALCORN, 1988).

Nos Estados Unidos, a doença teve o primeiro relato em Nova Jersey, em 1878, e a sua primeira epidemia foi descrita em Connecticut em 1889 (DRECHSLER, 1923)

As primeiras citações da doença na cultura do milho na Argentina datam do ano 1944 (CAMPI, 1944), onde a autora explica que, em 1913, Hauman Merk, encontrou sobre folhas de milho e chamou-o de *Helminthosporium gramineum* Rab.; mas Lindquist, em 1928, na Facultad de Agronomia de La Plata, concluiu que deveria tratar-se de *H. turcicum*.

Na literatura pode ser citado com a abreviação *Ht*. Por exemplo, os genes que propiciam resistência são denominados assim. Nesse trabalho será abreviado como *Et*, por sua última denominação *Exserohilum turcicum*.

2.3.2 Sintomatologia

Os sintomas surgem aproximadamente uma semana após a inoculação do patógeno nas folhas (ELLIOT & JENKINS, 1946; VITTI, 1995), como lesões foliares de formato elíptico e alongado, variando o comprimento de 2,5-15,0 cm (Figura 1), predominantemente de cor cinza, às vezes verde-acinzentadas ou pardas, sem bordos delimitados de coloração parda-avermelhada. A expressão dos sintomas pode variar dependendo do cultivar (Figura 2).

Os primeiros sintomas iniciam nas folhas inferiores e progridem para a parte superior da planta. Em infecções severas, o número de lesões por folha aumenta e as folhas murcham, se torcem e secam. O aspecto geral do milho afetado é o de seca, as folhas ficam

torcidas, penduradas, como se tivessem sofrido os efeitos de geada, podendo levar a morte prematura da planta.

As espigas das plantas severamente afetadas são pequenas. Sobre as lesões foliares o patógeno esporula facilmente em condições favoráveis de umidade e temperatura, produzindo uma massa de esporos de coloração verde-oliva a preta (FERNANDES-VALIELA, 1969; REIS et al., 2004).

As lesões ocasionadas por patógenos necrotróficos, como *Et*, possuem crescimento extremamente variável, com tamanho final da lesão potencialmente bem maior que os patógenos biotróficos, podendo atingir vários centímetros quadrados de área lesionada (ULLSTRUP, 1974; BALMER, 1980).

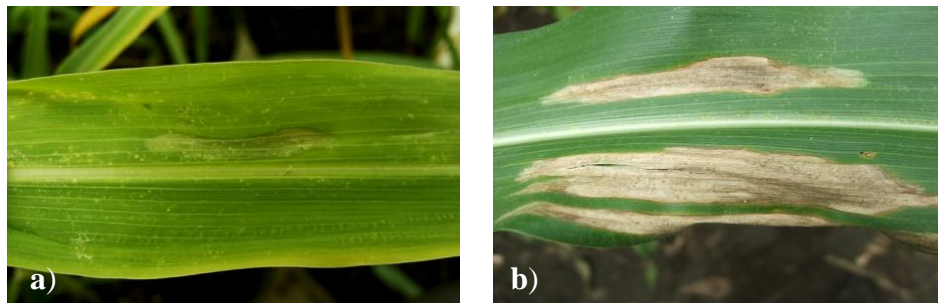


Figura 1. Sintomas de *Exserohilum turcicum*: a) iniciais e b) avançados.



Figura 2. Diferentes sintomas de *Exserohilum turcicum*, dependendo da reação do cultivar: suscetível (a); diferentes reações de hipersensibilidade (b) e (c).

2.3.3 Ocorrência e distribuição

São várias as espécies de *Helminthosporium* que podem causar doenças em milho. Em determinadas condições o fungo *H. maydis*, raça O, e *H. carbonum* podem causar danos, mas é o *Ht*, hoje denominado de *Exserohilum turcicum*, que apresenta ocorrência mais generalizada e que maiores problemas têm causado para cultivares suscetíveis na região Sul e nas chapadas da região Centro-Oeste do Brasil. A severidade da doença aumenta em condições de temperatura moderada, danos significativos no rendimento podem ser observados nas primeiras semeaduras de setembro e novembro e nos plantios de segunda safra (safrinha) (PEREIRA, 1995).

Esta é a helmintosporiose mais comum das que ocorre em milho no Brasil, e em alguns híbridos e locais, assume papel importante na produção sustentável da cultura. No Brasil, a helmintosporiose tem ocorrido esporadicamente em áreas aonde a temperatura e a umidade são mais elevadas (KAMIKOGA et al., 1991) apresentando, na maioria das vezes, correlação positiva entre a

intensidade da doença e danos no rendimento, para populações de milho pipoca e milho doce (QUEZADO-SOARES & LOPES, 1993).

No Brasil, a doença ocorre de forma generalizada e com severidade variável na região Centro Sul do país (FROSI & BALMER, 1980). Em plantios de inverno, na região Centro Sul, a severidade da doença geralmente é maior, pois o patógeno encontra condições ambientais favoráveis ao seu desenvolvimento, isto é, temperatura entre 18-27 °C e umidade atmosférica elevada (PINTO, 1997).

Na Argentina, segundo Idia (1966), a helmintosporiose do milho (ou queima das folhas) considerou-se como uma doença difundida em todas as áreas cultivadas com milho, tendo notado que ela constitui um problema grave em regiões tradicionais de cultivo de milho, mas sua ação geralmente foi mais grave no noroeste e nordeste.

Já no ano 2010, segundo Guerra & De Rossi, a helmintosporiose do milho foi a doença de maior prevalência no Centro Norte do estado de Córdoba, na Argentina. A partir da safra de 2007/08, esta doença manifestou-se todos os anos, apresentando severidades que variaram de acordo com a resposta genética dos cultivares.

Epidemias podem ocorrer considerando-se as condições climáticas e a suscetibilidade do híbrido (ELLIOT & JENKINS, 1946; RAYMUNDO & HOOKER, 1981; CARSON, 1995; RAMATHANI et al., 2011).

2.3.4 Danos e perdas

Os danos associados com as manchas foliares são decorrentes

do mau funcionamento e da destruição dos tecidos fotossintéticos devido ao aumento do número e da área de lesões que podem determinar a necrose de toda a folha. A necrose e a morte prematura das folhas limitam a interceptação da radiação solar e translocação de fotossintatos ao desenvolvimento de grãos (REIS et al., 2004).

A folha da espiga e as folhas imediatamente acima e abaixo da espiga podem representar 33 a 40 % da área total da planta (PATAKY, 1992). Uma redução de 50 % da radiação incidente 15 dias antes e 15 dias depois do florescimento pode provocar uma redução de 40 a 50 % no rendimento de grãos (FISCHER & PALMER, 1984). Segundo Fancelli (1988), uma destruição de 25 % da área foliar do milho em sua porção terminal, próximo ao florescimento, pode reduzir 32 % do rendimento.

A helmintosporiose do milho varia em incidência e severidade de ano para ano e de uma localidade para outra, dependendo, em grande parte, da composição genética das plantas e de condições ambientais. É uma doença policíclica e novas inoculações são necessárias para o desenvolvimento da doença, tornando-se altamente dependente esporulação de outras lesões (ULLSTRUP, 1966).

Durante epidemias, a incidência pode chegar a 100% provocando significativas reduções na produtividade (RAYMUNDO, 1981; CARSON, 1995; RAMADHANI et al, 2011).

Dependendo das condições climáticas, a queima das folhas de milho, pode afetar significativamente a produção e sua qualidade principalmente quando a infecção coincide com a época de floração (ULLSTRUP, 1970).

Quanto aos danos causados por *Et*, Chenulu & Hora (1962) e Hughes & Hooker (1971), relataram que estas podem variar de 27 a 90% na produção de grãos.

Leonard et al. (1985) relataram que *Et* em milho apareceu em proporções epidêmicas na Carolina do Norte (EUA), destruindo até 75 por cento da área foliar.

Uma redução de 18% no rendimento de grãos foi determinada por Perkins & Pedersen (1987) em inoculações em cinco estádios de crescimento, em híbridos com diferentes genes de resistência. Quando uma alta intensidade da doença for estabelecida antes do pendoamento, danos no rendimento de grãos podem chegar a 50% (SHURTLEFF, 1973).

Segundo Hooker & Perkins (1980), as reduções na produção de grãos de milho devido a queima das folhas podem ser evitadas se 75% ou mais dos tecidos da parte superior do dossel das plantas permanecerem sadios em pelo menos três quartos de período de enchimento dos grãos.

A aplicação dos fungicidas maneb + Zn, captafol e clorotalonil em plantas de milho pipoca da cultivar South América Mushroom foi eficiente no controle de *Et*, sendo que o controle da doença incrementou a produção em até 66% (ISSA, 1983).

Além da redução da produção devido a destruição de tecido fotossintético, a helmintosporiose também influi na maior suscetibilidade dos tecidos aos patógenos causadores de podridões do colmo (BALMER & PEREIRA, 1987).

Raymundo & Hooker (1981) observaram danos de até 62,3% na produção de híbridos, infectados antes da fase da floração feminina,

em condições favoráveis ao desenvolvimento da doença. A maior severidade registrada pelos autores, seis semanas após esta fase, foi de 97%.

Pataky (1992) observou relação semelhante entre a distribuição da severidade da doença na planta e a produção de espigas de milho-doce, e que as reduções em peso de espigas foram mínimas quando a severidade, na parte superior do dossel, foi menor do que 8% na época da colheita das espigas.

Segundo Pinto (1996) a queima da folha do milho, constitui um dos problemas fitossanitários que mais afeta a cultura do milho. As cultivares de milho pipoca são altamente suscetíveis a este patógeno. Quando os sintomas da doença aparecem antes do pendoamento, os prejuízos podem ser elevados (ISSA, 1983).

Segundo Pereira et al. (1993), a doença causada pelo fungo *Et* reduziu a produção e aumentou o tombamento das plantas quando comparado como controle nos híbridos testados.

Harlapur et al. (2000), na Índia, determinaram severidades da helmintosporiose do milho com percentagens desde 1 até 53,5%, e Babu et al. (2004) mediram desde 20 até 60 % de severidade. No mesmo país, os pesquisadores Shivankar & Shivankar (2000) e Patil et al. (2000) estimaram os porcentagens de dano de rendimento causados por essa doença, de 10,5 até 18,7% e de 13,6 até 50%, respectivamente.

Na Argentina, Guerra & De Rossi (2010) relataram que, em híbridos suscetíveis, os danos atingiram até 40% no rendimento de grãos nas safras de 2007/08 e 2009/10.

2.3.5 Etiologia e taxonomia

A helmintosporiose é causada pelo fungo que pertence a Divisão Amastigomicota, Classe dos Deuteromicetos, Ordem Moniliales, Família Dematiacea e ao Gênero e Espécie *Exserohilum turcicum* (Pass.) K. J. Leonard & E. G. Suggs (sinônimos *Helminthosporium turcicum* Pass.; *Bipolaris turcica* (Pass.) Shoemaker; *Drechslera turcica* (Pass.) Subramanian & P. C. Jain). A forma sexuada do patógeno é conhecida como *Setosphaeria turcica* (Luttrell) K. J. Leonard & E. G. Suggs (sinônimo *Trichometasphaeria turcica* Luttrell) (LUTTREL, 1958; SINAVESAN, 1987; ALEXOPOULOS et al., 1996).

O patógeno produz conídios de coloração verde-oliva ou marrom-escuro, fusiformes e ligeiramente curvos, com 3 a 8 septos, medindo de 20 x 105 µm, com hilo basal saliente e de germinação através de tubo germinativo polar. Os conidióforos são oliváceos, com 2 a 4 septos, medindo de 7-9 x 150-250 µm. Apesar de poder ser reproduzida em condições controladas, com o desenvolvimento de peritécios globosos e escuros, a ocorrência da fase sexual é rara na natureza. As ascas são cilíndricas, contendo de 1 a 8 ascósporos com três septos, hialinos, retos ou ligeiramente curvos e dimensões de 13-17 x 42-78µm (FREDERIKSEN & ODVODY, 2000) (Figuras 3 e 4).

Os conídios são fusiformes, obclavados a fusiformes ou cilíndricos, retos ou ligeiramente curvos, verde-cinza a olivácio, com germinação comumente em uma ou ambas células polares, raramente nas células supramediano e o terceiro é mediano ou variável; apresenta hilo bastante protuberante. Os conídios medem 18-32 x 50-144 µm,

apresentando 4-9 pseudoseptos. Os conidióforos são oliváceos, lisos ou verruculosos, com 2-4 septos e medem 150-250 x 8-10 μm (ELLIS, 1971; SIVANESAN, 1987) (Figuras 3 e 4).

O fungo pode produzir clamidósporos internamente nos conídios, de formato globoso, que são formados com noites sucessivas de baixa temperatura (aproximadamente 10°C) associados aos resíduos culturais (BOOSALIS et al., 1967; LEACH et al., 1977) (Figura 4).

A forma sexuada, *S. turcica*, raramente ocorre na natureza, mas pode ser produzida em laboratório, pareando-se isolados compatíveis em meio de cultura. A maturação dos peritécios de *S. turcica* desenvolve-se em três semanas quando fragmentos de colmo de cevada esterilizados em óxido de propileno são parcialmente imersos em meio de ágar de Sachs e inoculados com blocos de micélio a partir de colônias puras e mantidos em incubação a 25°C. Os peritécios maduros são pretos e elipsoidais a globosos, medindo 359-721 μm em diâmetro. Desenvolvimento esparço de pelos na parte superior da região do ostíolo são observados em peritécios maduros. Ascas são cilíndricas ou cilíndrica-obclavada com suporte curto e medem 176-249 x 24-31 μm . Ascas produzem normalmente 1-6 ou 2-4 esporos maduros, dificilmente podendo ocorrer 8 ascospores (LUTTRELL, 1958; SIVANESAN, 1987).

O fungo apresenta heterotalismo com dois grupos de compatibilidade sexual (“A” e “a”) para a formação da fase perfeita *S. turcica* (L.) Leonard & Suggs (LUTTRELL, 1958).

A reprodução é quase totalmente assexuada, produzindo só conídios. A distribuição desigual de tipos de pareamento e de desequilíbrio de fase gamética dentro de regiões tropicais tem sido

sugerido para ser o resultado da reprodução sexual, possivelmente, enquanto que o fungo é residente em material vegetal em decomposição (BORCHARDT et al, 1998; RAMATHANI et al, 2011).

Como muitos patógenos ascomicetos, *S. turcica*, passa a maior parte de sua vida como um organismo haplóide, só se tornando diplóide para um breve estágio durante recombinação sexual antes de sofrer meiose para produzir ascósporos haplóides (MOGHADDAM & PATAKY, 1994).

A fase sexual, entretanto, tem sido até agora não relatado em condições de campo (SHARANAPPA, 2005; MARTIN, 2011).

Em experimento de combinação de 12 isolados de *Et*, Soares et al. (1993) relataram que 16 combinações, das 66 possíveis, produziram o teleomorfo *S. turcica*, inoculados no meio de Sach-ágar com colmo de cevada (Lutrell, 1958). Nenhum dos isolados inoculados individualmente foi capaz de produzir a forma perfeita, o que confirmou a natureza heterotática desse fungo. A formação dos peritécios ocorreu cerca dos 18 dias, e os ascósporos formaram-se 9 a 13 dias após da formação do peritécio.

Com base na informação da sequência 28S de ADN, espécies de *Setosphaeria*, tais como *S. túrcica*, são colocados dentro da família Pleosporaceae (KODSUEB et al., 2006). Essa família contém muitos patógenos de monocotiledôneas importantes economicamente, incluindo espécies de *Cochliobolus*, tais como *C. heterostrophus* (anamorfo *Bipolaris maydis*) o agente casual da mancha foliar do sul em milho, espécies de *Alternaria* que ataca um grande número de espécies vegetais e *Pyrenophora*, com espécies como *P. teres* que faz a mancha foliar em cevada (MARTIN, 2011).

Em 2011, o genoma v1.0 de *S. turcica* foi completado utilizando Roche (454) Sanger Fosmids, e consenso no Joint Genome Institute (www.jgi.doe.gov). O genoma de *S. turcica* é de 43 Mbps em tamanho compreendendo 11.702 modelos preditivos de genes (MARTIN, 2011).

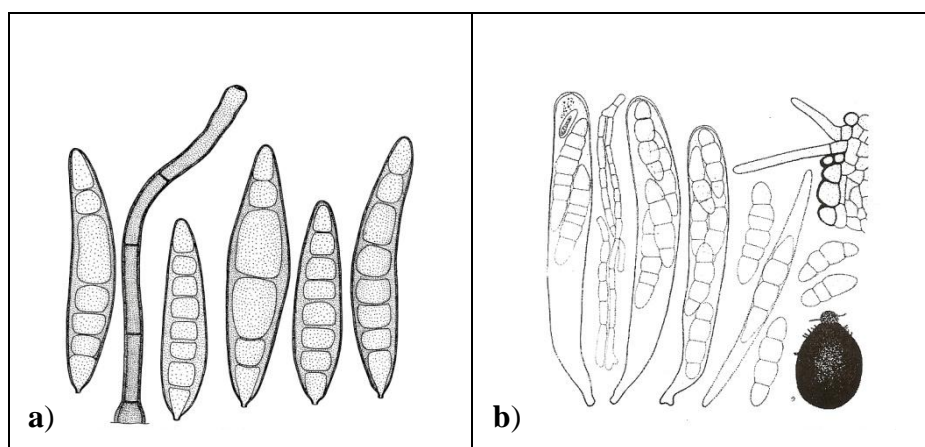


Figura 3. a) Conídios e conidióforo de *Exserohilum turcicum* (Ellis, 1971), b) ascas, ascosporos e peritécio de *Trichometasphaeria turcica* (Sivanesan, 1987).



Figura 4. a) Conídio, b) conidióforos, c) clamidósporos de *Exserohilum turcicum*.

2.3.6 Meios de cultura

A esporulação de *Et* depende de fontes adequadas de carbono e nitrogênio (MALCA & ULSTRUP, 1962). Como fontes destes elementos podem ser utilizadas a xilose, a glicose e a asparagina (SOARES et al., 1993); outras fontes são a maltose e a lactose como fonte de carbono e a caseína hidrolisada como fonte de nitrogênio (ULLSTRUP, 1962; MASIAS & BERQGUIST, 1974; LEACH et al., 1977).

Segundo Nakamura & Gimenes-Fernandes (1993), a obtenção de conídios e conidióforos pode ser feita em meio de cultura V-8, com melhor esporulação na temperatura de 25°C.

Soares et al. (1993) relataram os meios de batata dextrose ágar (BDA) e tomate (MT) não conseguiram induzir a esporulação de todos os isolados de *Et* testados. Enquanto que no meio definido (MUCHOVEJ, 1986; modificado com: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,625g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,19 mg; $\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,16 mg; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,11 mg; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,01 mg) todos os isolados foram capazes de esporular abundantemente.

Tuite (1969) cita o meio de lactose caseína hidrolisada ágar (LCHA) como o meio apto para induzir a esporulação de *Et*. Esse meio é utilizado rotineiramente em muitos trabalhos com *Et* (MALCA & ULLSTRUP, 1962; TUIITE, 1969; PASCHOLATI & STANGARLIN, 1999; FROSI & BALMER, 1980a, 1980b; LEATH & PEDERSEN, 1983; THAKUR et al., 1989; KAMIKOGA et al., 1990; BIGIRWA et al., 1993; VITTI et al., 1995; BACH & KIMATI, 1995; FERNANDES & BALMER, 1991, 2002).

Alguns autores utilizaram também o meio de batata dextrose ágar (BDA) (HILU & HOOKER, 1965; CHANG & FAN, 1986; BOWEN & PEDERSEN, 1988; LEONARD et al., 1989).

2.3.7 Epidemiologia - Ciclo da doença

2.3.7.1 Condições ambientais predisponentes

Et requer, segundo Berger (1970), 7 horas de umidade relativa do ar a 100% e temperatura acima de 15 °C para uma significativa esporulação. Observações microscópicas sugerem que conídios de *Et* são formados durante a noite e liberados durante a parte de manhã.

A infecção de *Et* em milho pode ocorrer a partir da emergência das plântulas até a colheita. No entanto, a gravidade máxima foi notada a partir pendoamento e seis a oito semanas após espigamento o que resultou na perda de peso de grãos. A doença torna-se bem estabelecida antes ou no estágio de espigamento (CHENULU & HORA, 1962; ULLSTRUP, 1966).

O processo de infecção tem início e os sintomas são expressos pelas lesões foliares. As condições ideais para a ocorrência da doença são obtidas com temperaturas em torno de 20°C e com um mínimo de 8 h de molhamento (VITTI et al., 1993).

A duração do período de molhamento, além da temperatura, são os fatores ambientais mais importantes para a infecção e a esporulação de *Et* (LEVY & COHEN, 1983). Os mesmo autores relataram, que o período de molhamento mínimo requerido para a germinação conidial e formação do apressório de *Et* é de 1,3 e 4 horas,

respectivamente, a 20 °C. Para o estabelecimento da infecção, um mínimo de 5 horas de molhamento, a temperatura ideal, parece ser necessário (HILU & HOOKER, 1963; BERGER, 1973).

A incidência de *Et* em milho é favorecida pela umidade relativa maior que 80%, a temperatura média diária superior a 25 ° C, a semeadura tardia e plantios com alta densidade (PELMUS et al., 1986).

Sharma & Mishra (1988), em estudos da epidemiologia da helmintosporiose do milho, relataram que a doença surgiu durante quarta semana de novembro, quando a temperatura era 21,10 °C e umidade relativa do ar 75,20%.

Na Geórgia, Rússia, as condições mais favoráveis para o desenvolvimento da helmintosporiose do milho foram 22 a 25 °C de temperatura e 75 a 90% de umidade relativa (KHATRI, 1993).

O patógeno se desenvolve em temperaturas que variam entre 17-28 °C e moderada a alta umidade, mas pode tolerar duras condições climáticas (WHITE, 1999).

Sobre as lesões o fungo esporula abundantemente, produzindo conídios que são transportados pelo vento até novas folhas. O número de conídios capturados no ar é significativamente elevado no período de manhã, quando ocorreram noites com temperaturas entre 20-26°C e período de molhamento entre 10-12 horas, favorável a esporulação do fungo (MEREDITH, 1966; BERGER, 1970; BLEICHER & BALMER, 1993). Noites com orvalho contínuo favorecem o patógeno, no entanto, a epidemia da doença é retardada por tempo seco. O inóculo produzido sobre as lesões é responsável pelos ciclos secundários da doença.

Levy (1989) obteve o tamanho máximo de lesões de *Et* a 25 °C. De acordo com Bowen & Pedersen (1988), o crescimento ótimo das lesões de *Et* ocorre quando a temperatura mínima está acima de 20 °C e a máxima abaixo de 28 °C. Entretanto, segundo Levy (1991), o tamanho das lesões de *Et* é também dependente da agressividade do isolado.

Segundo Vitti et al. (1995) a estratégia evolutiva de *Et* esta baseada no crescimento das lesões. Esta estratégia independe de condições favoráveis de clima. Tendo garantido sua primeira infecção, o patógeno cresce no interior da planta, qualquer que seja a temperatura ou umidade exterior. A esporulação é pequena e depende da umidade. Esporulação no momento mais adequado significa economia de energia.

As condições ambientais favoráveis à ocorrência da doença são encontradas nos primeiros plantios, em agosto e setembro, e nos plantios após dezembro, considerados como plantios da safrinha. Nas regiões altas, as chamadas chapadas, estas condições podem ser observadas durante o ano todo. Crescimento da lesão é um parâmetro fundamental para o sucesso desse tipo de patógeno (VITTI et al., 1995).

A temperatura ideal para esporulação do fungo *Et* foi definida por diversos pesquisadores como 25 °C (BHOWMIK & PRASADA, 1970; FROSI & BALMER, 1980a, 1980b; LEATH & PEDERSEN, 1983).

Quanto a germinação de esporos de *Et* e sua penetração nas folhas, Ullstrup (1966) afirmou que teve lugar entre seis a 18 horas, quando a água estava presente nas folhas e temperatura variava entre 18 e 27 °C.

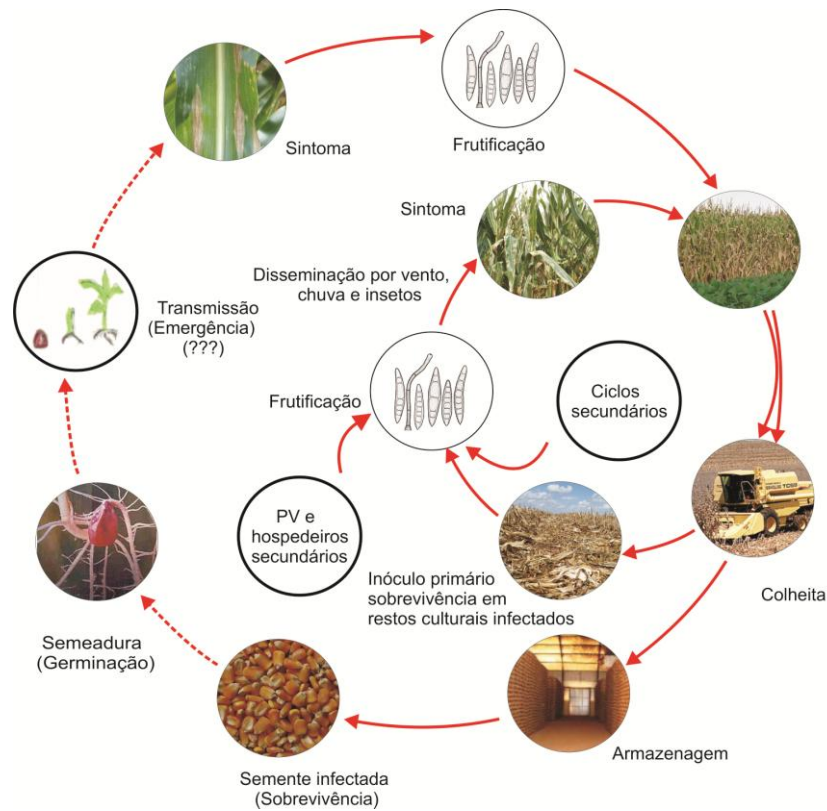


Figura 4. Ciclo da helmintosporiose do milho (Danelli & Reis, no prelo).

2.3.7.2. Infecção

A infecção começa quando um esporo de *Et* é depositado numa folha de uma planta suscetível. A colonização é dependente das condições climáticas específicas e geralmente começa após um período de orvalho, quando os níveis de umidade e temperatura são moderados e os níveis de luz são baixos. Quando os esporos germinam, as hifas começam a crescer de maneira, geralmente, bipolar. A germinação é dependente da luz. Com luz constante de $150 \mu\text{molE m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$ ou luz

azul (465-480 nm) a germinação é inibida em até 85%, quando comparado com as condições normais de luz (LEVY & COHEN, 1983). As hifas salientes do esporo crescem ao longo da superfície da folha e, em seguida, produzem um ou múltiplos apressórios. Desenvolvem-se a partir do apressório, que penetra diretamente através da cutícula e epiderme da folha e raramente através dos estômatos (KNOX-DAVIES, 1974; MUIRU et al, 2008).

Depois da penetração, o fungo continua crescendo até causar necrose e colapso dos tecidos. O micélio cresce através do tecido da folha e para dentro do sistema vascular, espalhando-se sistemicamente por toda a planta (MUIRU et al., 2008). O crescimento de micélio no xilema é abundante, bloqueando-o e causando murcha devido à deficiência de água (THAKUR et al., 1989). As lesões em desenvolvimento são em forma de charuto e de cor cinza até marrom e, normalmente, de 5-20 cm de comprimento, espalhando-se longitudinalmente ao longo da folha. A infecção é geralmente limitada ao material de folha da planta e não causa danos a semente diretamente. No entanto, as lesões foliares grandes e numerosas são suficientes para causar murchas e uma redução de área fotossintética e de reduzir o rendimento (RAYMUNDO & HOOKER, 1981).

2.3.7.3 Sobrevivência

O agente causal da helmintosporiose do milho é considerado um patógeno necrotrófico, apresentando uma fase parasitária na planta viva e uma fase necrotrófica nos restos culturais.

As principais fontes de inóculo de *Et* são: restos culturais infectados, hospedeiros secundários e clamidósporos (estrutura de repouso), e provavelmente, as sementes infectadas. Estes representam, também, os mecanismos de sobrevivência do fungo.

O fungo *Et* pode sobreviver de uma estação para a outra de cultivo sobre a palha (folhas, bainha das folhas e palha da espiga), na forma micelial, de conidióforos e conídios, e/ou como estrutura de resistência denominada clamidósporo (LUTTREL, 1958; BOOSALIS et al., 1967; LEVY & COHEN, 1983; SHURTLEFF, 1992; WHITE, 1999; PINGALI, 2000; LIPPS & MILLS, 2002).

A formação do peritécio raramente desenvolve-se sobre as determinadas regiões de plantio, condicionada por condições climáticas predisponentes. Na Nova Zelândia, os clamidósporos são formados naturalmente em noites frias, com aproximadamente 10°C (LEACH et al., 1977).

O período de tempo de sobrevivência nos restos culturais é determinado, principalmente, pelas condições de temperatura, umidade e luz. Em geral, enquanto existir nutrientes e fonte de carbono disponível no substrato o fungo continuará explorando nutricionalmente o substrato e produzindo inóculo. Esta é a fonte de inóculo mais importante para a infecção das plantas de milho.

O fungo *Et* passa o inverno em folhas de milho infectadas e durante o seguinte verão esporos são formados sobre micélio localizado sobre e nas lesões antigas (ULLSTRUP, 1966).

Shree & Luke (1983) estudaram a capacidade de sobrevivência saprofítica do fungo *Et* em campos de sorgo e descobriram que a

sobrevivência do patógeno foi de 80% até três semanas da incubação, mas caiu para 10% após 12 semanas.

Taken et al. (1994) estudaram a sobrevivência de *Et* a partir de resíduo de milho infestado em Uganda e relataram que as epidemias locais da helmintosporiose do milho geralmente são originadas de conídios sobre os resíduos de milhos infestados. A severidade e a área baixa a curva do progresso da doença foram significativamente maiores nas parcelas com resíduos infestados do que em parcelas livres de resíduos.

A importância epidemiológica da semente ainda não está bem esclarecida. O potencial de inóculo e a taxa de transmissão do patógeno da semente para a parte aérea da planta não são conhecidos, necessitando desta maneira de trabalhos que possam explicar porque em determinadas lavouras semeadas em local onde nunca se cultivou o milho e sem lavouras nas proximidades ocorre a presença da helmintosporiose.

2.3.7.4 Hospedeiros

As seguintes espécies vegetais têm sido relatadas como hospedeiras de *E. turcicum*: milho (*Zea mays*); sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench); capim massambará, sorgo de alepo ou capim Johnson (*S. halepense* (L.) Pers.); capim sudão (*S. sudanense* (Piper) Stapf e o teosinto (*Euchlaena mexicana* Schrad.) (REIS et al., 2004).

Também foi isolado de folhas de *Panicum miliaceum* L. na Austrália; de *P. novemnerve* Stapf em Rodésia; de *Paspalum conjugatum* Bergius e *Sorghum margaritifolium* Stapf na África, e

Euchlaena mexicana Schrad. em Honduras, México e Estados Unidos (ROBERT, 1962).

Bach & Kimati (1992) verificaram que isolados de milho do Brasil são patogênicos ao milho e ao sorgo; isolados de capim massambará, são fracamente patogênicos ao milho e não patogênicos ao sorgo.

2.3.7.5 Disseminação

Durante a fase saprofítica o inóculo é produzido e disseminado principalmente pelo vento e respingos de chuva até os órgãos aéreos da planta de milho.

Estudos epidemiológicos com base nestas características são de fundamental importância para conhecer como é movimento e a disseminação dos patógenos. É importante já que a hipótese mais forte da disseminação de *Et* é pelo transporte de esporos pelo vento.

Segundo Meredith (1966), a violenta liberação de conídios de *Et* ocorre pela redução da pressão de vapor da água, atribuindo isto ao mecânico induzido ao conídio e conidióforo pela perda de água. Trabalhos em laboratório evidenciam que condições relacionadas a uma rápida redução na pressão de vapor fornecem a energia para a liberação dos conídios.

A temperatura, a velocidade do vento e a umidade relativa do ar influem no aumento da concentração de esporos de *Et* no ar (MEREDITH, 1966; BERGER, 1970; LEACH, 1977, BLEICHER & BALMER, 1993).

Outra fonte de disseminação muito importante dos patógenos é através da semente. Segundo McNew (1960), na natureza os patógenos procuram não se separar de seus hospedeiros. Com a mesma linha de pensamento, Smith (1995) relata que o inóculo na semente é responsável pelo transporte dos patógenos necrotróficos, desde os centros de origem das espécies vegetais para todos os locais de cultivo no mundo.

Tem sido timidamente afirmado que este patógeno é transmitido por sementes, porém sem suporte numérico. Pesquisadores que detalham o ciclo de vida do *Et* como Luttrell (1958), Boosalis et al. (1967), White (1999), Pingali (2000) e Lipps & Mills (2002), não fizeram referência a sua presença, ou não, em sementes de milho.

Segundo McGee (1988), a doença helmintosporiose do milho não tem sido citada como capaz infectar sementes de milho ou ser transmitida para os órgãos verdes.

Os manuais para análise sanitária de sementes de milho do CIMMYT (WARHAM et al., 2002) e do MAPA (BRASIL, 2009), apresentam a possibilidade da presença de *Et* em sementes de milho, baseados no texto “Identificação das espécies de *Drechslera* em sementes” de CHIDAMBARAM et al. (1979), onde os autores citam a presença do fungo *Drechslera turcica* (sinônimo de *Et*) em milho e outras espécies, referindo-se a presença do patógeno em sementes de *Sorghum bicolor* (L.) Moench. e *S. vulgare* Pers., não em milho.

2.3.8 Manejo

2.3.8.1 Raças - Resistência - Fontes de Resistência

A existência de raças fisiológicas de *Et* tem sido relatadas em diversos trabalhos. A raça O é prevalecente em muitas partes do mundo (FALLAH MOGHADDAM & PATAKY, 1994). A raça 1 foi assinalada nos Estados Unidos em 1978 (TURNER & JOHSON, 1980). Outras raças foram isoladas de milho em Havaí, China, México, Uganda e Zâmbia (WELZ & GEIGER, 1993).

No Brasil, Almeida & Heidrich-Sobrinho (1978) observaram variabilidade no comportamento de linhagens de milho Rio-Grandense e de quatro linhagens americanas frente a cinco isolados do patógeno, provenientes do estado de Rio Grande do Sul. Em 1981, Heidrich-Sobrinho & Hermes sugeriram a presença de raças fisiológicas em isolados de *Et* sobre 20 linhagens de milho.

Fernandes & Balmer (2002) relataram a existência de no mínimo duas raças fisiológicas de *Et*, entre isolados do Brasil, que puderam ser diferenciadas utilizando-se as cultivares Pirapoca e Iw, sendo que uma raça, representada pelo isolado J/P9, causou lesões necróticas na cultivar Pirapoca, enquanto que Iw apresenta-se como resistente. Por outro lado, outra raça, representada pelo isolado C/PR6, causou lesões necróticas de o tipo suscetível nas cultivares mencionadas, vencendo, portanto a resistência representada pelo gene Ht1.

Cinco raças já foram identificadas de acordo com as reações de resistência e susceptibilidade de genótipos de milho portando os genes

Ht1, Ht2, Ht3 e HtN (MASIAS & BERGQUIST, 1974; WINDES & PEDERSEN, 1991), denominadas raças 0, 21, 23, 2N e 23N (LEONARD et al., 1989).

No Brasil, no ano 1995, Pereira (1995) fez um análise da disponibilidade de germoplasma resistente para as doenças de milho, onde relatou que o comportamento de híbridos comerciais em relação a *Et* estava composto por 44% resistentes, 37% intermediários e 20% suscetíveis.

Nas regiões produtoras de milho no Brasil, Gianasi et al. (1996) identificaram as raças fisiológicas de *Et* 0, 2, 3, N, 1N, 2N, 3N, 12N, 23 N e 123N, utilizando as linhagens diferenciadoras B37 Ht1, B37 Ht2, A619 Ht3, B37 HtN e M64.

Existem dois tipos de resistência para *Et* no milho: monogênica e poligênica. A primeira, controlada pelo Ht1, Ht2 e Ht3, é caracterizada pela formação de lesões cloróticas e esporulação reduzida ou, quando presente o gene HtN, o híbrido que o contém, não evidencia lesões até após a polinização. A resistência poligênica é caracterizada pela menor quantidade de lesões e de menor tamanho (LEONARD et al., 1989).

A resistência poligênica foi a primeira a ser descoberta e utilizada no controle da queima da folha do milho. Esta resistência é expressa na forma de menor número e tamanho das lesões do tipo susceptível, com pequeno decréscimo na esporulação, quando em condições favoráveis de umidade e temperatura (JENKINS & ROBERT, 1952; PATTERSON et al., 1963; HILU & HOOKER, 1965; ULSTRUP, 1970, HUGHES & HOOKER, 1971).

A resistência monogênica foi encontrada em milho pipoca procedente do Peru. A reação deste genótipo a infecção por *Et* é caracterizada por lesões necróticas menores circundadas por um extenso halo clorótico (HOOKER, 1961; ULLSTRUP, 1963; HOOKER, 1977; HOOKER & TSUNG, 1980). Este tipo de resistência foi demonstrando ser governado por um gene dominante (HOOKER, 1961, 1963) que tem sido designado Ht. Em lesões de plantas com resistência monogênica, observa-se um atraso na necrose dos tecidos e também uma inibição da esporulação do patógeno (OBI et al., 1980).

A resistência a *Et* foi identificada em linhas puras, viz., B-37, CM-104, PTR, Ade-C, Phill DMR-1 e Phill DMR-8 (LAXMINARAYANA & SHANKARLINGAM, 1983). Pedersen (1984) avaliou 85 linhagens e nove seleções de Iowa da base sintética BS8 para resistência do tipo clorótica causada por isolados de *Et* de Estados Unidos. Estes materiais foram avaliados em Iowa, Illinois e Pensilvânia. Onze linhagens e três seleções foram resistentes em todos os lugares testados. A linha pura Tlaltizapan 8146 foi relatada para ser resistente e as linhas Guira 8046, Sadaf, Coimbatore S 440 e Across 8146 foram moderadamente resistentes a helmintosporiose do milho (HOSAIN, 1987).

Harlapur et al. (1999) realizaram estudos de campo em 37 linhagens de milho artificialmente inoculadas e relataram CI-4, CM-104 e Nal-147 como fontes de resistência para *Et*. Reação intermediária foi relatada em CM-111, CM-501, CM-121, KDMI-12 e CM-118. Ramdutta et al. (2005) estudaram 26 linhagens de milho em condições de casa de vegetação e observaram que as linhas CM-104, CM-105 e CM-118 foram resistentes a *Et*.

Os genes responsáveis pela determinação de raças em *Et* são pouco compreendidos, no entanto, os genótipos de milho utilizados para avaliar raças contêm genes individuais R, possivelmente indicando o sistema gene a gene (LIM et al., 1974), mas mais complexos rações de segregações têm sido observados (MOGHADDAM & PATAKY, 1994).

A presença de várias raças do patógeno e a variabilidade em termos de agressividade implica que, os programas de melhoramento de milho devem visar à incorporação de resistência poligênica que é mais durável, garantindo assim aos agricultores uma proteção confiável de sua cultura.

2.3.8.2 Toxinas e Enzimas

O agente patogênico *Et* facilita sua penetração e colonização com a produção de uma gama de metabólitos secundários e toxinas. O genoma de *Et* contém dois genes que codificam enzimas xilanases, que degradam arabinoxilano na parede celular da planta, causando perda de integridade e auxiliando a penetração (DEGEFU et al., 1997; DEGEFU et al., 2004).

Catalases foram detectados a partir de culturas em meio de cultura, onde duas isoformas particulares mostraram implicações na germinação esporos e no processo infeccioso inicial (KEISSAR et al., 2002).

Muitas toxinas foram isoladas a partir de *S. turcica* (ROBESON & STROBEL, 1982; ZANG et al., 2007). Uma toxina, *Helminthosporium turcicum* toxina (HT), tem sido identificada como

uma fitotoxina lipofílica chamada Monocerin. Monocerin aplicada em plantas de milho e de sorgo causa inibição da síntese de clorofila, redução do crescimento da raiz e lesões e necrose em genótipos suscetíveis (CUQ et al, 1993; ZANG et al, 2007). Além disso, onde foi tratado com Monocerin pode se desenvolver necrose que se espalha por todo o sistema vascular sugerindo que o Monocerin HT-toxina não é apenas envolvida na penetração, mas também em fases posteriores da infecção (CUQ et al., 1993).

Segundo Bach et al. (2005), as fitotoxinas isoladas de plantas de milho foram capazes de reproduzir os sintomas da mancha foliar causada pelo patógeno *Et*. Os mesmos autores relatam que plantas tratadas com toxinas isoladas de milho apresentaram necrose enquanto as plantas recebendo somente suspensão de conídios apresentaram lesões.

Quanto ao efeito das toxinas em plântulas de milho, Bach et al. (2005) relataram que plantas de milho suscetíveis a *Et* (variedades Ag 64^a e M28C) apresentaram 20,55 a 33,33% de inibição no desenvolvimento nas plântulas, os resultados demonstraram que as toxinas obtidas do fungo *Et* apresentam a capacidade de retardar o desenvolvimento das plântulas, deixando-as mais sensíveis ao ataque do patógeno.

Os mesmos autores em tratamentos com toxinas em folhas destacadas relataram que nas variedades suscetíveis (Ag 64A e M28C) as toxinas dos isolados de milho induziram necrose (como na formação de lesões) e nas variedades resistentes (Ag 303 e Ag 405), apenas clorose.

Em estudos com TLC e HPLC, com isolados de *Et* provenientes de Alemanha, Áustria e Quênia, Mainu (2008) revelou a presença de 2 ou 3 fitotoxinas produzidas por vários isolados de *Et*. De todos os isolados avaliados 48,3% foram encontrados produzindo fitotoxinas a vários níveis. Os fitotoxinas induziram sintomas característicos nas folhas, que foram semelhantes aos sintomas observados após a inoculação com o patógeno.

2.3.8.3 Fungitoxicidade de fungicidas *in vitro*

Singh & Kaiser (1989) relataram que Bavistin (carbendazim) e Vitavax (carboxina) inibiram completamente o crescimento micelial e a germinação de conídios de *Et*, causador da mancha foliar do milho.

Rahman et al. (1993) observaram que Tilt (propiconazol) foi eficaz contra *Et* em milho em condições *in vitro*.

Em estudos *in vitro*, carboxina, mancozeb e zinebe foram altamente eficazes na inibição do crescimento micelial de *Et* (DHARANENDRASWAMY, 2003).

Gonzalez & Gonzalez-Varela (2007) relataram que, em estudos da concentração mínima inibitória *in vitro*, foram eficazes no controle do crescimento do micélio do fungo *Et*, os fungicidas flusilazol + carbendazim, epoxiconazol, flutriafol e ciproconazol, e não apresentaram controle os fungicidas carbendazim, clorotalonil e azoxistrobina.

2.3.8.4 Eficiência de fungicidas a campo

As formulações de manebe foram as mais efetivas em minimizar a gravidade *Et* sob condições de campo seguido por zirame, vacide e Z-65. Esses fungicidas aumentaram o rendimento de grãos e a qualidade das sementes (COX, 1956).

Segundo Berger (1973), o fungicida mancozeb teve boa eficiência no controle de *Et* em milho-doce, não registrando efeito fitotóxico nessa cultura.

A aplicação dos fungicidas maneb + Zn, captafol e clorotalonil em plantas de milho pipoca da cultivar South América Mushroom foi eficiente no controle de *Et*, sendo que o controle da doença incrementou a produção em até 66% (ISSA, 1983).

Três aplicações de propiconazole, a intervalos semanais, foram eficazes na redução da taxa de desenvolvimento da mancha foliar por *H. turcicum* em milho (BOWEN & PEDERSON, 1988).

Sharma & Mishra (1988) descobriram que a infecção de *Et* em milho foi efetivamente controlada por seis pulverizações de mancozeb (0,2%), a intervalos de 10 dias, a partir de três dias após inoculação aos 30 dias após a semeadura. A taxa de infecção e classificação de gravidade foi reduzida e o rendimento de grãos foi aumentado com este tratamento.

Singh & Kaiser (1989) relataram que o tratamento de sementes com Bavistin (carbendazim) ou Vitavax (carboxina) reduziram de forma eficaz a incidência da queima das folhas causada por *Et* em plantas de milho, sob condições epifíticas artificiais.

Begum et al. (1993) avaliaram cinco fungicidas para o controle de infecções artificiais de *Et* em cultivares de milho sensíveis. Todos os produtos químicos reduziram a intensidade da doença e aumentaram o rendimento de grãos, com mancozeb sendo claramente o mais eficaz, seguido por carbendazim, zineb, tiofanato metílico e, por último oxicleto de cobre.

Para o controle de *Et* os tratamentos com tebuconazol foram altamente eficientes independente da formulação e da dose utilizada. O fungicida mancozeb mostrou menor eficiência, tendo sido apenas superior a testemunha (PINTO, 1997).

Na cultura do sorgo, Cota et al. (2010) relataram que a mistura dos fungicidas epoxiconazol e piraclostrobina foi eficiente no controle de *Et*.

Precisa-se de mais informação sobre a eficiência de controle da helmintosporiose do milho com fungicidas a campo. Existem muitas divergências nas literaturas citadas, principalmente porque a maioria dos trabalhos trata de fungicidas antigos e com poucas informações da porcentagem de controle obtida.

2.3.8.5 Controle biológico

Mahamood et al. (1995) relataram que os fungos *Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp. e alguns fungos não identificados foram altamente eficazes no crescimento micelial e na esporulação de *Et*, agente causal da mancha foliar do milho.

Stangarlin & Pascholati (1994) relataram a possibilidade de que preparações de *Saccharomyces cerevisiae* podem proteger tecido foliar

de milho contra *Et*, possivelmente através de mecanismos envolvendo a antibiose e/ou a indução de resistência.

2.3.9 Manejo integrado

O uso genótipos resistentes, tolerantes e de fungicidas, assim como a rotação de culturas e a eliminação de hospedeiros secundários, tem sido relatados para o manejo da helmintosporiose do milho. No entanto, nenhuma destas medidas é isoladamente eficaz em nível de campo. Não foi achada informação específica sobre o manejo integrado desta doença. É necessário manejar esta doença através da combinação de diferentes medidas.

A estratégia mais adequada e econômica para manejar a helmintosporiose do milho é através da exploração da resistência do hospedeiro, que é ambientalmente amigável e também conveniente para se adaptar ao nível dos agricultores. A resistência da planta hospedeira desempenha um papel significativo na abordagem do manejo integrado da doença. Assim, a identificação de genes resistentes e genótipos para esta importante doença e combinando-as com as características produtivas é uma prioridade programa de melhoramento do milho (SHARMA et al., 2005).

As estratégias de controle, recomendadas em outras culturas, mas que podem ser utilizadas no milho visam principalmente, a redução de inóculo nas fontes primárias, sejam elas sementes ou restos culturais. Através da semente infectada o patógeno é introduzido em novas áreas. Isto deve ser evitado pelo uso de sementes saudáveis ou,

ainda, pelo tratamento de sementes com o método eficiente de modo a erradicar o patógeno (FORCELINI & REIS, 1997).

CAPITULO I

MORFOLOGIA DE CONÍDIOS E PATOGENICIDADE EM MILHO DE ISOLADOS DE *Exserohilum turcicum* DA ARGENTINA E DO BRASIL

ROBERTO LUIS DE ROSSI¹

RESUMO - A cultura do milho é uma das principais “commodities” da Argentina e do Brasil. Seu rendimento é reduzido por agentes nocivos, sendo um deles o fungo *Exserohilum turcicum* (*Et*) agente causal da helmintosporiose do milho. O presente trabalho teve como objetivo comparar as características morfológicas dos conídios e a patogenicidade de dez isolados de *Et* obtidos da Argentina e do Brasil. Cinco isolados monospóricos de cada país foram cultivados em meio LCHA (lactose caseína hidrolizada ágar) durante 15 dias a 25 ± 2 °C e na ausência de luz. Prepararam-se lâminas microscópicas para a mensuração de 200 conídios de cada isolado. Na média os conídios mediram 10-25 x 30-135 µm, apresentando 2-8 septos. Detectaram-se diferenças estatísticas ($p = 0,05$) entre os 10 isolados de *Et* para todas as variáveis medidas (comprimento, largura e número de septos). Apesar da variação, as características mensuradas coincidiram com as registradas na literatura. Na comprovação da patogenicidade, plantas

¹Engenheiro Agrônomo, mestrando do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de Concentração em Fitopatologia.

do híbrido de milho Pioneer P1630, de conhecida suscetibilidade a *Et*, foram cultivadas em vasos plásticos, mantidas em casa-de-vegetação com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas. As plantas foram inoculadas com a deposição de 0,5 mL de uma suspensão de conídios de *Et* na concentração de 5×10^4 conídios/mL, quando atingiram a quarta folha expandida. Decorridas duas semanas, quantificou-se o número de lesões/folha e a mensuração das lesões, com auxílio de um paquímetro digital e a severidade estimada. Os dez isolados produziram, após os 15 dias da inoculação, uma média de 2,5 lesões/folha; de 39,7 x 3,4 mm de comprimento e largura respectivamente; e 4% de severidade estimada. Não se observou diferenças significativas na patogenicidade dos dez isolados estudados para nenhum dos critérios patométricos. Houve diferenças morfológicas entre os isolados da Argentina e do Brasil, porém não quanto à patogenicidade; e confirma-se que os isolados utilizados neste trabalho pertencem à espécie *Et*.

Palavras-chave: helmintosporiose, *Zea mays*, *Helminthosporium turcicum*, morfologia, patogenicidade

**CONIDIA MORPHOLOGY AND PATHOGENICITY IN CORN
OF *Exserohilum turcicum* ISOLATES FROM ARGENTINA AND
BRASIL**

ABSTRACT - Maize is one of the most important commodities in Argentina and Brazil. The productivity of the crop could be reduced by different noxious agents such as *Exserohilum turcicum* (*Et*), a fungus that causes the Northern leaf blight of maize. Depending on the weather, the Northern leaf blight disease can significantly affect production. This study aimed to compare the morphological characteristics of conidia and pathogenicity in hybrid corn of *Et* isolates obtained from Argentina and Brazil. Five monoconidial strains of each country were cultured on LCHA (lactose-hydrolyzed casein agar) for 15 days at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ in darkness. For the measurement of 200 spores, microscopical slides were prepared for every isolate (four repetitions of 50). It was used a reticulum incorporated into the ocular micrometer of a binocular microscope. The average conidia measure was of $10\text{-}25 \times 30\text{-}135 \mu\text{m}$, with 2-8 septa. Statistical differences among the 10 *Et* isolates were detected ($p = 0.05$) for all the variables measured (length, width and number of septa). Despite the variation recorded, the conidia characteristics matched those reported in the literature. For pathogenicity tests, hybrid corn plants Pioneer P1630 were grown in plots and maintained in a greenhouse at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ and 12h photoperiod. Plants were inoculated by deposition of 0.5 ml of a 50,000 spores per ml *Et* suspension (fourth leaf expanded stage). After two weeks, the number of lesions and lesions per leaf were quantified with a digital caliper. All the isolates produced an average of 2.5

lesions per leaf. There was no significant difference in the pathogenicity of strains for any of the pathometrics criteria. There were morphological differences between Argentinean and Brazilian isolates but not in pathogenicity, confirming that they closely related belong to *Et* species.

Key-words: Northern leaf blight, *Zea mays*, *helminthosporium*

1. INTRODUÇÃO

O milho, *Zea mays* L., é um dos grãos alimentares mais antigos sendo considerado como uma das tres principais culturas de cereais no mundo, juntamente com arroz e o trigo (FAO, 2012).

O Brasil produziu 56,3 milhões de toneladas de milho na safra 2011-2012, e exportou 8,5 milhões de toneladas. A Argentina, na mesma safra, produziu 20,3 milhões de toneladas de milho, e exportou 14,5 milhões de toneladas (FAO/GIEWS, 2012).

Entre as condições adversas que o milho pode enfrentar estão as doenças, entre elas a helmintosporiose do milho, causada por *Exserohilum turcicum* Leonard & Suggs (sinom. *Helminthosporium turcicum* Pass) [teleomorfo *Setosphaeria turcica* (Lutterell); sinon. *Trichometasphaeria turcica* Lutterell Leonard & Suggs)] é uma das principais doenças foliares do milho (FREDERIKSEN, 1991).

Durante epidemias de *Exserohilum turcicum* (*Et*), a incidência em plantas pode chegar a 100%, provocando reduções significativas do rendimento (RAYMUNDO, 1981; CARSON, 1995; RAMATHANI et al, 2011).

Epidemias esporádicas ocorrem mais freqüentemente nas regiões sul e oeste do Brasil, onde causam danos severos no rendimento de grãos (ESTEVES, 1989), de até 50% (RAYMUNDO & HOOKER, 1981).

A helmintosporiose do milho é a doença de maior prevalência no centro-norte do estado de Córdoba, na Argentina. A partir de 2007/08, a doença manifestou-se em todas as safras, apresentando severidades que variaram de acordo com as características genéticas

dos cultivares. Em híbridos suscetíveis os danos atingiram até 40%, nas safras de 2007/08 e 2009/10 (GUERRA & DE ROSSI, 2010).

O milho é intensamente cultivado na Argentina e no Brasil, e muitas empresas produtoras de sementes de milho trabalham em ambos os países. Geralmente existe intercâmbio de material genético, visando obter melhores híbridos comerciais adaptados a cada área produtora. Nas regiões produtoras de milho no Brasil, Gianasi et al. (1996) identificaram as raças fisiológicas de *Et* 0, 2, 3, N, 1N, 2N, 3N, 12N, 23 N e 123N, utilizando as linhagens diferenciadoras B37 Ht1, B37 Ht2, A619 Ht3, B37 HtN e M64. A informação das raças presentes na Argentina não foi encontrada na literatura consultada, nem com as empresas produtoras de sementes de milho consultadas.

Por isso, é importante comparar a morfologia e a patogenicidade de isolados de *Et*, da Argentina e do Brasil. A hipótese testada foi de que há diferenças morfológicas e patogênicas entre os isolados.

O presente trabalho teve como objetivo comparar as características morfológicas dos conídios de 10 isolados de *Et* (cinco da Argentina e cinco do Brasil) e suas patogenicidades em híbrido de milho suscetível.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de folhas de milho, com sintomas da helmintosporiose, oriundas da Argentina e do Brasil, foram analisadas nos anos de 2011 e 2012, no Laboratório de Fitopatologia - Micologia da Universidade de Passo Fundo - RS (UPF).

2.1 Identificação e caracterização do agente causal

2.1.1 Obtenção dos isolados

As amostras foliares foram registradas, herborizadas, identificadas e armazenadas em envelopes, constituindo uma coleção de isolados de *Et*.

O patógeno foi isolado de discos de 9,0 mm de diâmetro, recortados de folhas contendo parte da lesão e do tecido sadio. Realizou-se a assepsia do material pela imersão em álcool 96% por um minuto, enxaguando-os em água destilada e, em seguida, transferidos para uma solução aquosa de hipoclorito de sódio 1%, por três minutos e enxaguados novamente com água destilada e estéril, por três vezes, para remover o excesso do hipoclorito. Após a desinfestação, foram distribuídos 25 discos, de cada amostra, em caixas de acrílico, tipo gerbox de poliestireno cristal (11 x 11 x 3,5 cm de altura), com tampa. No fundo do recipiente foi depositada uma espuma de polietileno (5 mm de espessura) e, sobre essa, duas folhas de papel filtro. O material absorvente foi embebido com água destilada e estéril, até a saturação da espuma, constituindo uma câmara úmida. O material foi levado à câmara de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas, em prateleiras com três lâmpadas fluorescentes, 40 W de potência, localizadas a 50 cm acima dos gerboxes.

2.1.2 Detecção e identificação de *Exserohilum turcicum*

A avaliação foi realizada após dois dias de incubação, com um microscópio estereoscópico, identificando a presença de conídios de *Et* sobre os discos foliares. Da esporulação do fungo no tecido vegetal, retiraram-se conídios, com o auxílio de uma agulha histológica flambada e, transferidos para placas de petri contendo meio de lactose caseína hidrolisada ágar (LCHA), preparado segundo Tuite (1969).

2.1.3 Isolamento monospórico

Os isolamentos monospóricos do fungo foram realizados para cinco amostras oriundas da província de Córdoba, Argentina e cinco amostras do estado do Rio Grande do Sul, Brasil, obtidas no ano 2011 (Tabela 1). Após o desenvolvimento das colônias, adicionou-se 10 mL de água destilada esterilizada, em cada placa, para a remoção dos conídios. Posteriormente, com o auxílio de um pincel de pelo de camelo número 20, foi feita a remoção dos propágulos. Dessa suspensão, foram pipetados 350 µL para cada placa de petri contendo o meio ágar-água (FERNANDEZ, 1993). Com o auxílio de uma alça de Drigalsky, distribui-se a suspensão na superfície do meio de cultura e incubou-se a 25 ± 2 °C, por 3-6 horas, com luz contínua.

Na realização do isolamento monospórico, identificou-se, em microscópio óptico, aumento de 100 x, conídios germinados, quando o pró-micélio atingiu o tamanho menor que a metade do diâmetro do conídio. Com o auxílio de uma agulha histológica flambada, cortaram-se pequenas porções do meio, contendo apenas um conídio germinado.

Cada fragmento foi transferido para uma placa de petri contendo meio de cultura de LCHA. As placas foram incubadas em câmara climatizada, em ambiente controlado, por 15 dias e, após transferiu-se parte da colônia jovem do fungo para tubos de ensaio contendo meio de cultura batata sacarose ágar (BSA) e armazenados na micoteca do laboratório, em refrigerador, a 5 °C.

Tabela 1. Identificação de isolados monospóricos de *Exserohilum turcicum*, de milho

País	Cultivar	Denominação
Argentina	AW 190 MGRR2	01-AR
Argentina	DK 670 MG	02-AR
Argentina	DK 747 MGRR2	03-AR
Argentina	NK 910 TD Max	04-AR
Argentina	P31Y05 H	05-AR
Brasil	AG 9045 convencional	01-BR
Brasil	AG 8011 Pro	02-BR
Brasil	AG 9010 Pro	03-BR
Brasil	DKB 350 Pro	04-BR
Brasil	AG 8025 H	05-BR

2.1.4 Caracterização morfológica dos conídios dos isolados

A caracterização morfológica dos conídios foi realizada após a montagem de lâminas individuais dos dez isolados do fungo. Com o auxílio de uma agulha histológica flambada, retiraram-se pequenas porções da colônia, com quinze dias de crescimento em meio LCHA, e depositaram-se sobre uma lâmina contendo uma gota de lactofenol e, cobertos com uma lamínula.

Foi mensurado o comprimento, a largura e o número de septos de 50 conídios por lâmina; utilizou-se para as medidas um retículo micrométrico incorporado à ocular de um microscópio bi-nocular (Olympus CX31), no aumento de 400 x. Cada lâmina constitui-se numa unidade experimental, para cada isolado foram realizadas quatro repetições.

2.1.5 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Scott & Knott, a 5% de significância. As análises foram realizadas no software InfoStat 2010 (DI RIENZO et al., 2010).

2.2 Prova de Patogenicidade

2.2.1 Cultivo das plantas

Plantas de milho foram cultivadas em vasos plásticos contendo 2 kg de solo utilizando-se sementes do híbrido do milho Pioneer P1630H (de conhecida susceptibilidade a *Et*), híbrido simple, hiperprecoce, com o gene Herculex®. Após a emergência, realizou-se o desbaste, permanecendo três plântulas por recipiente. As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas.

2.2.2 Multiplicação do inóculo

Para se obter a concentração desejada de conídios para a inoculação, procedeu-se a sua multiplicação. Com o auxílio de uma agulha histológica flambada, pequenas porções da colônia, de cada isolado de *Et*, preservada em tubos de ensaio em meio BDA, foram transferidas para placas de petri contendo o meio de cultura LCHA, para estimular sua esporulação. Em seguida, as placas foram vedadas com papel filme de PVC e levadas para uma câmara climatizada, a 25 ± 2 °C e escuro, por um período de 15 dias, até obter-se esporulação abundante.

2.2.3 Inoculação em plantas de milho

A inoculação foi feita com os 10 isolados, quando as plantas atingiram o estágio fenológico V4 (quarta folha expandida, apresentando colar, lígula e aurículas visíveis) (RITCHIE et al., 1993). Com o auxílio de um micropipetador, ajustado para 0,01 mL, foi feita a contagem de doze gotas em microscópio óptico, ajustando a concentração para 5×10^4 conídios/mL. Depois da inoculação, foram vertidos 350 µl da suspensão em meio ágar-ágar e, após de 3-6 horas, quantificou-se a germinação e obtendo-se a concentração efetiva corrigida.

Para melhorar a cobertura e o molhamento das folhas com a suspensão do inóculo, foi adicionado o tenso ativo poli-oxi-etileno-sorbitano monolautaro (Tween 20, Sigma Chemical Co) na proporção de uma gota/L. A inoculação foi realizada por meio da deposição de

0,5 mL do inóculo no cartucho das plântulas. No tratamento controle (testemunha), a deposição foi feita apenas com água mais o tenso ativo. Foram observadas quatro repetições dos tratamentos. Após a inoculação, as plantas permaneceram em casa-de-vegetação com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas, por 14 dias.

2.2.4 Fitopatometria

Decorridas duas semanas, quantificou-se o número de lesões/folha e a mensuração das lesões, com auxílio de um paquímetro digital (marca Mitutoyo, modelo 500-143B). Considerou-se apenas as lesões com comprimento maior ou igual a 2 mm. Também foi determinada a severidade, estimada visualmente.

2.2.5 Reisolamento do fungo de lesões em folhas de milho

Para completar o teste de patogenicidade, realizou-se o reisolamento do fungo, das folhas com sintomas da helmintosporiose, em meio LCHA. Previamente, realizou-se a desinfestação dos discos do tecido foliar em solução aquosa de hipoclorito de sódio a 1%, por três minutos, após lavados com água destilada, retirando o excesso do desinfestante. Em seguida, os discos foram distribuídos em caixas de acrílico, tipo gerbox, preparadas como anteriormente descrito (no ponto 2.1.1), e mantidos em câmara de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas. Após dois dias de incubação, com um microscópio estereoscópico, foi identificada a presença de *Et*. Da esporulação do fungo no tecido vegetal, retiraram-se conídios, com

o auxílio de uma agulha histológica flambada e transferida para placas de petri contendo meio LCHA. Decorridas duas semanas foi realizada a caracterização morfológica dos conídios após a montagem de lâminas individuais dos dez isolados do fungo.

2.2.6 Análise estatística

Os ensaios foram realizados duas vezes utilizando, na análise estatística, as médias dos dados. Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de significância. As análises foram realizadas no software InfoStat 2010 (DI RIENZO et al., 2010).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Identificação e caracterização do agente causal

Quanto às características morfológicas de largura e de comprimento, obtidas por meio das mensurações de duzentos conídios, de cada um dos dez isolados do fungo, os esporos mediram, em média, 10,3-20,3 x 46,5-128,3 μm , apresentando 2-8 septos por conídio, sendo os valores mínimos e máximos de largura e comprimento de 10-25 x 30-147 μm , respectivamente (Tabela 2).

As dimensões da largura dos conídios, dos 10 isolados, variaram entre 10 e 25 μm , sendo a média de 15 μm . A maior largura mínima foi determinada no isolado 02-BR, com 12,5 μm ; os demais isolados apresentaram largura mínima de 10 μm . A largura máxima foi

determinada no isolado 04-BR, com 25 μm . O isolado 04-BR apresentou a maior média de 16,3 μm e, o isolado 01-BR, apresentou a menor, de 13,8 μm (Tabela 2 - Figura 1).

O comprimento dos conídios variou de 30 a 147,5 μm , média de 95,7 μm . O menor comprimento foi determinado no isolado 03-AR com 30 μm , e o maior no isolado 04-AR, com 147,5 μm . No isolado 03-AR determinou-se o menor comprimento médio (85,1 μm) e no isolado 05-AR determinou-se o maior, com 105,3 μm (Tabela 2).

O número de septos variou de 2 a 8 por conídio, sendo que o isolado 04-BR apresentou a menor média (4,4) e o maior foi determinado no isolado 02-BR (5,2).

Houve diferenças significativas na morfologia dos conídios entre os dez isolados, mas todos próximos das mensurações descritas na literatura. Os valores obtidos de largura e comprimento ficaram próximas as mensurações descritas por Ellis (1971), de 18-32 x 50-144 μm , mas variaram quanto ao número de septos, onde Ellis cita entre 4-9 septos. Segundo Shurtleff (1992), os conídios apresentam tamanho 20 x 105 μm (não especificando os valores mínimos e os máximos) e entre 3 e 8 septos por conídio. Assim, os valores relatados por Shurtleff ficaram ainda mais aproximados aos determinados neste trabalho.

As diferenças observadas podem ser devidas aos diferentes substratos utilizados, idade das colônias e, principalmente, a variabilidade genética (Tabela 3).

Tabela 2. Caracterização morfológica de conídios de isolados monospóricos de *Exserohilum turcicum* obtidos de híbridos de milho coletados na Argentina e no Brasil

Isolado	Largura (µm)*			Comprimento (µm)*			Septos (nº)*		
	Mínima	Máxima	Média	Mínimo	Máximo	Médio	Mínimo	Máximo	Médio
01-AR	10,0	22,5	14,8 c**	47,5	125,0	95,2 b	2	8	4,6 c
02-AR	10,0	20,0	14,4 d	40,0	125,0	92,0 c	2	7	4,9 b
03-AR	10,0	17,5	14,2 d	30,0	115,0	85,1 d	2	7	4,9 b
04-AR	10,0	20,0	15,5 b	55,0	147,5	105,0 a	2	7	4,9 b
05-AR	10,0	20,0	15,0 c	62,5	135,0	105,3 a	2	8	4,9 b
01-BR	10,0	20,0	13,8 d	37,5	125,0	91,9 c	2	6	4,6 c
02-BR	12,5	20,0	15,7 b	57,5	122,5	92,8 c	3	7	5,2 a
03-BR	10,0	20,0	14,1 d	40,0	127,5	94,8 b	2	7	4,6 c
04-BR	10,0	25,0	16,3 a	52,5	132,5	96,9 b	2	8	4,4 c
05-BR	10,0	20,0	15,7 b	42,5	127,5	98,4 b	3	7	4,8 c
Media	10,3	20,3	15,0	46,5	128,3	95,7	2,2	7,2	4,8
CV (%)	14,4			16,1			20,8		

*Medias de quatro repetições em meio LCHA

**Medias seguidas pela mesma letra, nas columnas, não diferem pelo teste Scott & Knott a 5%.

Knox-Davies & Dickson (1960) relataram evidência da ocorrência de heterocariose, sugerindo que a grande variabilidade na morfologia do fungo *Et* pode estar relacionada com esta característica.

Ogasawara et al. (1971), citaram que os isolados de *Helmintosporium* spp., geralmente, perdem a capacidade de esporular no meio sintético provavelmente devido as alterações bioquímicas, a nível de aminoácidos, que ocorrem durante a formação de conídio. Diante disso, há a possibilidade de haver influência do meio utilizado como substrato para depois realizar a caracterização morfológica. Esse cuidado com o substrato para determinações morfológicas não foi explicitado na literatura consultada.

Bach & Kimati (1995) realizaram comparações morfológicas dos conídios de dez isolados de *Et* provenientes de milho, nove deles do Brasil, e um dos Estados Unidos. No trabalho desses autores, foi utilizado o meio BDA para o desenvolvimento dos isolados, tendo-se obtido, na média, 17,67 µm x 108,93 µm para o comprimento e a largura respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3. Características morfológicas de conídios de *Exserohilum turcicum* segundo vários autores

Autor	Largura (μm)	Comprimento (μm)	Septos (n°)	Días das colônias -Meio
Ellis (1971)	18-32	50-144	4-9	-
Chidambaram (1973)	17-22,1	96,9-125,8	4-7	-
Shurtleff (1992)	20,0	105,0	3-8	-
Bach & Kimati (1995)	17,67	108,93	-	(-)-BDA
De Rossi (2012)*	10-25	30-147	2-8	15-LCHA
De Rossi (2012)**	10,3-20,3	46,5-128,3	2-8	15-LCHA

*valores mínimo e máximo, **médias

Quando são comparadas as características morfológicas dos isolados da Argentina com os do Brasil, houve diferenças significativas entre eles, mas próximos das mensurações descritas na literatura internacional. Os isolados da Argentina apresentaram em média 14,78 μm x 96,52 μm para o comprimento e a largura respectivamente, e os do Brasil, apresentaram 15,12 μm x 94,96 μm (Tabela 4).

Tabela 4. Comparação das características morfológica de conídios de *Exserohilum turcicum* obtidos da Argentina e do Brasil

País	Largura (μm)	Comprimento (μm)	Septos (n°)
Argentina	14,78 b	96,53 a	4,86 a
Brasil	15,13 a	94,93 b	4,70 b
CV (%)	15,3	17,2	22,1

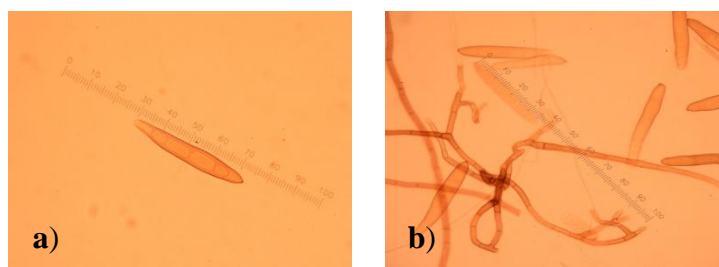


Figura 1. Estruturas de *Exserohilum turcicum*: a) conídio do isolado 02-BR, b) conídios e conidióforo do isolado 03-AR.

3.2 Patogenicidade

Os resultados positivos das inoculações confirmaram a patogenicidade dos dez isolados de *Et* em milho suscetível (Tabela 5; Figura 2).

Os esporos dos dez isolados estudados neste trabalho, após de três a cinco horas em meio ágar-ágar, apresentavam germinação superior a 98%, coincidindo em quanto ao tempo necessário com HILU & HOOOKE (1964), onde os autores relatam a ocorrência da germinação dos conídios de *Et* entre três e seis horas, e com STANGARLIN & PASCHOLATI (1994) que observaram uma germinação, na média de cinco isolados de *Et*, de 97%, mas não explicitaram em que tempo.

Uma semana após a inoculação do patógeno nos cartuchos das plantas do milho do híbrido suscetível P1630, observaram-se as primeiras lesões foliares de formato elíptico e alongado, de cor verde-

acinzentadas, coincidentes com o registrado por ELLIOT & JENKINS (1946) e por BACH & KIMATI (1995) (Figura 2a).

Segundo Leonard (1989), existem dois tipos de resistência para *Et* no milho: monogênica e poligênica. A primeira (controlada pelo *Ht1*, *Ht2* e *Ht3*), é caracterizada pela formação de lesões cloróticas e esporulação reduzida ou, quando presente o gene *HtN*, o híbrido que o contém, não evidencia lesões até após a polinização. A resistência poligênica é caracterizada pela menor quantidade de lesões e de menor tamanho.

Duas semanas após a inoculação, no momento da avaliação, não observou-se diferenças significativas na patogenicidade dos dez isolados estudados para nenhuma das avaliações: número de lesões/folha, comprimento (mm), largura (mm) e severidade estimada. Assim como não foi registrada nenhuma expressão diferenciada entre os isolados, todos apresentando o mesmo formato e tamanho das lesões (Tabela 5; Figura 2a, 2b).

Os dez isolados produziram, aos 15 dias após da inoculação, média de 2,5 lesões/folha. Determinou-se que o isolado 05-AR foi o que apresentou maior número de lesões por folha, com 3,4, e o isolado 03-BR o menor número, 1,7 lesões/folha.

O comprimento médio das lesões foi de 39,7 mm; sendo que o isolado 05-AR apresentou o menor comprimento médio com 32,7 mm e o isolado 01-BR, o maior, com 47,9 mm. A largura média das lesões foi de 3,4 mm; a menor largura média, de 2,6 mm, foi produzida pelo isolado 02-BR e o 04-AR, a maior, com 4,5 mm.

A severidade estimada média obtida foi de 4 %; a menor, com 1,8 %, foi causada pelo isolado 02-BR e, a maior, pelo isolado 01-BR, com 5,8%.



Figura 2. Sintomas de *Exserohilum turcicum*: a) lesão com uma semana, b) lesão com duas semanas da inoculação.

Tabela 5. Lesões por folha, comprimento, largura e severidade estimada dos sintomas causados pela inoculação de dez isolados monospóricos de *Exserohilum turcicum* em folhas de milho

Isolado	Lesões/folha (n°)	Comprimento (mm)	Largura (mm)	Severidade (%)
01-AR	2,9* (1,6) n.s.**	35,5 (8) n.s.	3,1 (0,5) n.s.	5,1 (4,5) n.s.
02-AR	2,8 (0,9)	40,3 (10,3)	3,2 (0,3)	4,1 (3,1)
03-AR	2,7 (1,6)	46,9 (23,5)	3,5 (1,0)	5,5 (4,4)
04-AR	2,3 (1,3)	37,2 (11,8)	4,5 (3,7)	4,0 (3,6)
05-AR	3,4 (2,1)	32,7 (9,2)	3,6 (0,7)	4,6 (2,8)
01-BR	2,5 (0,7)	47,9 (13,2)	3,5 (0,9)	5,8 (3,6)
02-BR	2,3 (0,5)	33,2 (14,5)	2,6 (0,7)	1,8 (0,1)
03-BR	1,7 (0,9)	44,4 (20,8)	3,3 (1,1)	1,9 (1,5)
04-BR	2,4 (1,1)	40,7 (13,5)	3,2 (1,0)	3,3 (2,5)
05-BR	2,1 (1,0)	38,2 (15,9)	3,2 (0,7)	4,3 (4,7)
Média	2,5 (1,2)	39,7 (14,1)	3,4 (1,0)	4,0 (3,1)

*Medias de quatro repetições, os valores entre parênteses representam o desvio

**n.s. valores não significativos pelo teste Tukey a 5%

4. CONCLUSÕES

Pela caracterização morfológica e patogenicidade comparadas com descrições da espécie disponíveis na literatura, determinou-se que houve diferenças morfológicas entre os isolados da Argentina e do Brasil quanto ao tamanho, largura e número de septos dos conídios de *Et*, porém não quanto a patogenicidade.

CAPITULO II

MEIO SEMI-SELETIVO PARA A DETECÇÃO DE *Exserohilum turcicum* EM SEMENTES DE MILHO

ROBERTO LUIS DE ROSSI¹

RESUMO - A helmintosporiose do milho, causada por *Exserohilum turcicum* (Et), é uma doença de ocorrência generalizada nas regiões produtoras de milho e milho-pipoca. Trata-se de uma doença com alto potencial de danos e há muitos anos estudada, mas ainda sem a certeza da presença do agente causal em sementes. Devido a esse fato, é fundamental a disponibilidade de métodos sensíveis que permitam detectar e quantificar o inóculo nas sementes, mesmo com incidência baixa. O objetivo desse trabalho foi desenvolver um método de detecção do fungo, e quantificar sua presença infectando e/ou infestando sementes de milho e de milho-pipoca. Utilizando-se sementes infectadas artificialmente por meio de sua deposição sobre micélio do fungo, foi obtido um meio semi-seletivo composto de sulfato de estreptomicina (500 mg/L), sulfato de neomicina (600 mg/L), carbendazim (60 mg/L) e captana (30 mg/L), agregados ao meio de lactose caseína hidrolisada ágar (LCHA). Com o meio semi-seletivo detectou-se o fungo em sementes de milho infectadas naturalmente com 0,124% de incidência, em quatro amostras de dez

¹Engenheiro Agrônomo, mestrando do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de Concentração em Fitopatologia.

analisadas. Determinou-se também a infestação de semente de milho, com 1,04 conídios por semente. Mediante isolamento, prova de patogenicidade, caracterização morfológica e pela comparação com descrições da espécie disponíveis na literatura, confirmou-se que o fungo isolado de sementes foi *Et*. Propõem-se a denominação do meio semi-seletivo como meio de De Rossi & Reis.

Palavras-chave: helmintosporiose, *Zea mays*, *Helminthosporium turcicum*, sanidade de sementes.

SEMI SELECTIVE MEDIUM FOR *Exserohilum turcicum* DETECCION IN CORN SEEDS

ABSTRACT - The Northern leaf blight of maize caused by *Exserohilum turcicum* (*Et*) is a disease of widespread occurrence in regions producing corn and popcorn. It is well known that the disease has a high potential for crop damage, but it is still uncertain if the pathogen can be present in seeds. It is essential to have available and sensitive methods to detect and quantify the inoculum on seeds, even with low incidence. The aim of this study was to develop a method for fungal detection and quantification in infested or infected corn and popcorn seeds. Different media and methods were tested. A semi-selective medium was obtained by adding to the LCHA medium 500 mg/l of streptomycin sulfate, 600 ml/l neomycin sulfate, 60 ml/l carbendazim and 30 mg/l captan, and was tested by using artificially infected seeds that were obtained through deposition on fungal

mycelium. The semi-selective medium allowed the detection of naturally infected seed with 0.124% of incidence. The seed infestation was of 1.04 conidia per seed. Morphological characterization and pathogenicity tests allowed the confirmation of *Et* as the fungus recovered from the seeds. We propose to name the semi-selective medium as De Rossi and Reis medium.

Key-words: Northern leaf blight, *Zea mays*, *Helminthosporium turcicum*, seed health test

1. INTRODUÇÃO

A helmintosporiose do milho (*Zea mays* L.), causada por *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs, é uma doença de ocorrência generalizada em todo mundo (CARSON & VAN DYRE, 1994). Pode causar redução da área foliar sadia durante o período de enchimento dos grãos, resultando em danos de 50% ou mais em cultivares suscetíveis (PERKINS & PEDERSEN, 1987).

Segundo Barba (2001), a maioria dos parasitos necrotróficos utiliza-se da semente como veículo de disseminação, abrigo e meio de sobrevivência. Alguns autores afirmam que a semente infectada introduz os parasitos necrotróficos nas áreas de cultivo (REIS & CASA, 1996; PINTO, 1996; ZAMBOLIM et al., 2000).

Tem sido timidamente afirmado que este patógeno é transmitido por sementes, porém sem suporte numérico. Pesquisadores que detalham o ciclo de vida do *E. turcicum* (*Et*), como Luttrell (1958), Boosalis et al. (1967), White (1999), Pingali (2000) e Lipps & Mills (2002), não fizeram referência a sua presença, ou não, em sementes de milho. Os manuais para análise sanitária de sementes de milho do CIMMYT (WARHAM et al., 2002) e do MAPA (BRASIL, 2009), apresentam a possibilidade da presença de *Et* em sementes de milho, baseados no texto “Identificação das espécies de *Drechslera* em sementes” de CHIDAMBARAM et al. (1979), onde os autores citam a presença do fungo *Drechslera turcica* (sinônimo de *Et*) em milho e outras espécies, referindo-se a presença do patógeno em sementes de *Sorghum bicolor* (L.) Moench. e *S. vulgare* Pers., não em milho.

Para a detecção de microrganismos associados a sementes existem vários testes; entretanto, nem todos permitem o desenvolvimento de todos os patógenos presentes ou de patógenos específicos.

Os patógenos podem estar associados às sementes tanto dentro como fora, ou entre elas. Sendo assim, o transporte de patógenos por sementes pode ser efetuado de três maneiras: a) acompanhando a semente, mas não se adere a elas, encontra-se em mistura com as sementes, fazendo parte da fração impura do lote, b) o patógeno pode estar aderido externamente à semente, nesse caso diz-se que a semente está infestada, c) o patógeno está localizado internamente na semente, seja nas camadas externas ou no embrião. A infecção é a maneira mais freqüente de transporte dos patógenos. Nessa condição, as sementes são consideradas infectadas, resultando na transmissão do patógeno das sementes a progênies (REIS & CASA, 1998; MACHADO, 2000).

A análise de rotina de sanidade de sementes contribui para a avaliação da qualidade de lotes de sementes em culturas de importância econômica, provavelmente devido ao fato de suas sementes transportarem patógenos, que podem causar danos à germinação ou, quando transmitidas aos órgãos aéreos, causar doenças na cultura, afetando a produção (MORAES, 1995).

Para a obtenção de dados confiáveis da relação entre transporte de patógenos por sementes e danos na cultura, é fundamental a existência de métodos sensíveis que permitam detectar e quantificar o inóculo nas sementes (MENTEN, 1995), mesmo com incidências baixas.

Para a análise da sanidade de sementes, podem ser utilizados vários métodos de detecção, e sua escolha depende da semente a ser analisada e dos patógenos a serem quantificados; depende também, do interesse de quem solicita a análise (se o interesse é quantificar todos os patógenos presentes nas sementes ou somente determinados patógenos que, quando transmitidos aos órgãos aéreos, podem causar grandes danos à lavoura). Para isso, existem meios de cultura seletivos, que permitem detectar patógenos específicos e não seletivos, que permitem detectar um maior número de patógenos presentes nas sementes. Os testes de sanidade de sementes visam fornecer subsídios ao tratamento químico (ZAMBOLIM, 2004).

Quando a análise patológica de sementes visa detectar a presença de fungos específicos, o emprego de meios seletivos ou semi-seletivos torna-se uma ferramenta de extremo valor para o fitopatologista, pois evita o desenvolvimento de contaminantes, favorecendo, eficientemente, a detecção e identificação do patógeno alvo (RICHARDSON, 1985 apud BARBA, 2001).

O fundamento da incubação de sementes em meio agarizado consiste no estímulo à formação de colônias típicas dos fungos (MACHADO, 1988).

Smith (1995) cita que o inóculo na semente é responsável pelo transporte e disseminação dos patógenos necrotróficos dos órgãos aéreos dos hospedeiros, desde os centros de origem das espécies vegetais para todos os locais de cultivo no mundo. Para Reis et al. (2009), a tarefa de produção de sementes indenizadas (livre de patógenos ou sadias) é o maior desafio aos fitopatologistas.

O princípio do meio seletivo para detecção de um fungo específico é a exclusão seletiva de microrganismos indesejáveis que podem interferir no desenvolvimento do fungo-alvo de estudo (TSAO, 1970).

Em geral, os meios seletivos constituem-se de modificações ou adaptações de meios agarizados já utilizados rotineiramente em testes de detecção. Sendo que, estas modificações podem ser feitas pela adição ou redução de substâncias químicas como fungicidas e antibióticos e também modificações nutritivas do meio.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método de detecção de *Et* em sementes de milho e quantificar sua presença infectando e infestando sementes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Fitopatologia - Micologia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV) da Universidade de Passo Fundo (UPF), durante os anos 2011 e 2012.

2.1 Obtenção de meio semi-seletivo para *Et*

2.1.1 Semente utilizada

Semente dos híbridos de milho P1630H (híbrido simple, hiperprecoce, com o gene Herculex®) e Celeron (híbrido duro, superprecoce, com tecnologia Viptera, TL, TG, TL/TG), foram

utilizados para detectar e quantificar a presença de *Et* infectando sementes.

2.1.2 Embebição das sementes (pré infecção artificial)

Prévio a inoculação artificial, as sementes foram embebidas com água numa câmara úmida para facilitar a penetração do patógeno.

As sementes foram distribuídas em caixas de acrílico, tipo gerbox de poliestireno cristal (11 x 11 x 3,5 cm de altura), com tampa. No fundo do recipiente foi colocada uma espuma de polietileno e, sobre esta, duas folhas de papel filtro. O material absorvente foi embebido com água destilada, até a saturação da espuma, constituindo uma câmara úmida. O material foi levado à câmara de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, no escuro, por 10 horas.

2.1.3 Infecção artificial das sementes pela exposição à colônia do fungo

Depois da pré embibição, as sementes foram colocadas, por 36-48 horas (dependendo de cada híbrido até que uma semente iniciasse o processo de germinação), com escutelo para abaixo, sobre o micélio de colônias puras de *Et* do isolado 02-AR (capítulo I), com 15 dias de crescimento, em meio de batata dextrose ágar (BDA). No término desse tempo foram retiradas e colocadas a secar em câmara de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C por outras 48 horas.

2.1.4 Meios de cultura comparados

Foram utilizados os meios: i) de Reis (REIS, 1983), ii) de lactose caseína hidrolisada ágar (LCHA) (TUIITE, 1969), e iii) semi-seletivo LCHA modificado.

O meio de Reis é utilizado para a determinação de fungos de parede obscura como *Bipolaris sorokiniana* (Sacch) Shoemaker. O meio de LCHA é o indicado para estimular a esporulação de *Et*. Aproveitando essa característica, esse meio foi modificado visando facilitar a detecção de *Et* em sementes de milho.

Assim, em vários experimentos prévios, várias substancias foram testadas agregadas ao meio LCHA, incluindo fungicidas, tais como carbendazim e captana, e agentes bactericidas como sulfato de estreptomicina e sulfato de neomicina, para inibir fungos e bactérias indesejáveis.

Foram testadas distintas possibilidades de combinações ao LCHA, não suplementado, ou suplementado, com várias concentrações dos agentes antimicrobianos citados, até selecionar o meio proposto.

2.1.5 Preparo dos meios semi-seletivos

No preparo dos meios de cultura observou-se os protocolos de acordo com Reis (1983), para o meio semi-seletivo de Reis, e com Tuite (1961), para o meio lactose caseína hidrolisada ágar (LCHA).

Meio semi-seletivo de Reis: o meio de cultura foi preparado dividindo-se em duas partes, (A) consistiu de 15 g de batata cozida em 700 mL de água destilada, obtendo-se um caldo de batata que foi

colocado em Erlemeyer de 2000 mL onde foram adicionados 15 g de ágar e 2,5 g de sacarose e autoclavado a 120 °C por 20 minutos; e (B) 0,5 g de sulfato de estreptomicina, 0,3 g de neomicina e 0,3 g de benomil, sendo que cada produto foi dissolvido em três balões volumétricos contendo 100 mL de água destilada esterilizada em cada balão. Após autoclavada a parte A foi esfriada a uma temperatura de aproximadamente 45 °C. Em câmara de fluxo laminar as partes A e B foram misturadas e foram adicionados ao meio 5 mL de botram e 3 mL de captam, cada um de uma suspensão estoque que consistiu de 0,20 g de botram e 0,133 g de captam cada um em balões volumétricos contendo 100 mL de água destilada esterilizada.

Meio de LCHA (TUIITE, 1969): em Erlemeyer de 2000 mL foram adicionados i) caseína hidrolisada 3 g/L, ii) ágar 10 g/, iii) lactose 37,5 g/L, iv) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/L, v) $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,43 g/L, vi) $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/L, vii) $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 0,72 g/L, num volume final de 1000 mL, após a diluição fez-se a correção do pH, para 6.

Meio de LCHA modificado: várias substancias foram testadas agregadas ao meio LCHA, para inibir fungos e bactérias indesejáveis.

2.1.6 Plaqueamento das sementes

As sementes infectadas artificialmente, foram desinfestadas antes do plaqueamento pela imersão numa solução aquosa de hipoclorito de sódio a 1% por três minutos, e após lavadas três vezes em água destilada para remover o resíduo do hipoclorito.

Quatro sub mostras de 25 sementes foram plaqueadas em caixas gerbox, contendo os meios já descritos, com auxílio de pinça previamente flambada, e distribuídas de forma equidistante.

Foram incubadas em câmara de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas, em prateleiras com três lâmpadas fluorescentes de 40 W de potência, localizadas a 50 cm acima dos gerboxes, por 7-10 dias.

Todos os métodos constaram de quatro repetições de 25 sementes por tratamento, num total 100 sementes. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e a unidade experimental constituída por um gerbox. Cada ensaio foi repetido três vezes, totalizando assim 300 sementes analisadas por tratamento.

A avaliação foi realizada após 7 a 10 dias de incubação, sob lupa esteroscópica com 50x de aumento, identificando a presença de micélio e/ou conídios de *Et* sobre as sementes.

Com os dados obtidos foi realizada a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

2.2 Detecção e quantificação da infecção natural de *Exserohilum turcicum* em sementes de milho e de milho-pipoca

2.2.1 Obtenção das amostras

Foram utilizadas sete amostras de sementes de milho comercial: AG 8011 YG, Celeron TL, DKB 390, Exp 3949, P1630 H e P32R22 (Passo Fundo), P1630 H (Erechim) e três amostras de milho-pipoca: Pipoca I (P625), Pipoca II e Pipoca III (Passo Fundo), sendo

esses dois últimos sem identificação varietal fornecidos por agricultor que produz semente própria.

2.2.2 Detecção de *Exserohilum turcicum* nas sementes

Para a detecção de *Et* nas sementes de milho, foram utilizados cinco métodos: i) papel de filtro com congelamento, ii) meio de batata dextrose ágar (BDA), iii) meio de Reis (REIS, 1983), iv) meio de lactose caseína hidrolisada ágar (LCHA) (TUIITE, 1969), e v) meio semi-seletivo LCHA modificado.

As sementes foram desinfestadas, antes do plaqueamento, pela imersão numa solução aquosa de hipoclorito de sódio a 1% por três minutos, e após foram lavadas três vezes em água destilada para remover o resíduo do hipoclorito.

No método de papel filtro com congelamento (i), as sementes foram dispostas individualmente sobre duas camadas de papel de filtro umedecido com água destilada, mantendo se distanciadas 1-2 cm uma das outras, no interior de recipientes de plástico tipo gerbox. Os recipientes foram deixados 24 horas em câmara de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas, em prateleiras com três lâmpadas fluorescentes de 40 W de potência, localizadas a 50 cm acima dos recipientes. Finalizado esse tempo foram colocadas em congelador a -20 °C por 24 horas, e após retornaram na câmara de crescimento por sete dias.

Nos métodos com meio agarizado (ii, iii, iv e v) as sementes foram plaqueadas, com auxílio de pinça previamente flambada, e distribuídas de forma equidistante, 25 sementes em recipientes de

plástico tipo gerbox. As sementes foram incubadas em câmara de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas, em prateleiras com três lâmpadas fluorescentes de 40 W de potência, localizadas a 50 cm acima dos gerboxes, por 7-10 dias.

Utilizaram-se quatro repetições de 100 sementes por tratamento, num total 400 sementes. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Cada ensaio foi repetido três vezes, totalizando assim 1.200 sementes analisadas por tratamento.

A avaliação foi realizada depois de 7 a 10 da incubação, sob lupa binocular (50 x), considerando-se infectada a semente com a presença de conidióforos e conídios de *Et*.

O experimento final foi realizado após a execução de vários ensaios preliminares que visaram a detecção de *Et* em sementes.

2.2.3 Confirmação do agente causal

2.2.3.1 Caracterização morfológica

Para a confirmação do agente causal, todas as sementes infectadas por *Et*, foram transferidas para placas de petri contendo meio LCHA e induzir a esporulação do fungo. As placas foram incubadas em câmara climatizada, em ambiente controlado, por 15 dias e, após transferiu-se parte da colônia jovem do fungo para tubos de ensaio contendo meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) e armazenados na micoteca do laboratório, em refrigerador a 5°C.

A caracterização morfológica dos conídios foi realizada após a montagem de lâminas individuais dos isolados do fungo feitos das

sementes infectadas. Com o auxílio de uma agulha histológica flambada, retiraram-se pequenas porções da colônia, com quinze dias de crescimento em meio LCHA, depositando-se sobre uma lâmina contendo uma gota de lactofenol e, sobre estas, uma lamínula. Foi determinado o comprimento, a largura e o número de septos de 50 conídios por lâmina, em microscópio óptico, aumento de 400 x observando-se quatro repetições.

2.2.3.2 Prova de patogenicidade

2.2.3.2.1 Cultivo das plantas

Seis sementes de milho foram semeadas em vasos plásticos contendo 2 kg de solo utilizando-se sementes do híbrido Pioneer P1630 H, de conhecida susceptibilidade a *Et*. Após a emergência, realizou-se o desbaste, permanecendo três plântulas por recipiente. As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas.

2.2.3.2.2 Multiplicação do inóculo

Com o auxílio de uma agulha histológica flambada, pequenas porções da colônia, de cada isolado de *Et*, preservadas na micoteca, foram transferidas para placas de petri contendo o meio LCHA. As placas foram vedadas com papel filme de pvc e levadas para câmara climatizada, a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e escuro, por um período de 15 dias, até obter-se esporulação abundante.

2.2.3.2.3 Inoculação em plantas de milho

A inoculação foi realizada pela da deposição de 0,5 mL do inóculo (concentração de 5×10^4 conídios/mL) no cartucho das plântulas, quando atingiram o estágio fenológico V4 (quarta folha expandida, apresentando colar, lígula e aurículas visíveis) (RITCHIE, 1993). Para melhorar a cobertura e o molhamento das folhas, foi adicionado o tenso ativo poli-oxi-etileno-sorbitano monolautaro (Tween 20, Sigma Chemical Co) na proporção de uma gota/L. No tratamento controle (testemunha), a deposição foi feita apenas com água mais o tenso ativo. Foram observadas quatro repetições de cada isolado de fungo obtido de semente, cada repetição foi um vaso contendo três plantas. Após a inoculação, as plantas permaneceram em casa de vegetação com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas.

2.2.3.2.4 Reisolamento do fungo de folhas de milho com sintomas

Para completar a prova de patogenicidade, realizou-se o reisolamento do fungo das folhas com sintomas em meio semi-seletivo de LCHA modificado. Previamente, realizou-se a desinfestação de discos do tecido foliar com sintomas em solução aquosa de hipoclorito de sódio a 1%, por três minutos, após lavados com água destilada, retirando o excesso do desinfestante. Em seguida, os discos foram distribuídos em gerboxes, no fundo do recipiente foi depositado uma espuma de polietileno e, sobre esta, duas folhas de papel filtro. O material absorvente foi embebido com água destilada, até a saturação

da espuma, constituindo uma câmara úmida, e mantida em câmara de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. Após dois dias de incubação, com um microscópio estereoscópico, foi identificada a presença de *Et*. Da esporulação do fungo no tecido vegetal, retiraram-se conídios, com o auxílio de uma agulha histológica flambada e transferida para placas de petri contendo o meio semi-seletivo LCHA modificado. Decorridas duas semanas foi realizada a caracterização morfológica dos conídios após a montagem de lâminas individuais dos isolados do fungo.

2.3 Detecção e quantificação da infestação de *Exserohilum turcicum* em grãos de milho

2.3.1 Origem da amostra

Neste trabalho foi utilizada uma amostra de grãos de milho do híbrido P1630, coletada numa lavoura que apresentava sintomas da helmintosporiose na safra 2011/12, localizada no município de Erechim, RS.

A amostra foi registrada e processada no Laboratório de Fitopatologia-Micologia da FAMV da UPF, acondicionada em saco de papel e armazenada em câmara fria.

2.3.2 Detecção da infestação de *Exserohilum turcicum*

A detecção dos esporos de *Et* aderidos à superfície das sementes foi feita pelo método de suspensão de lavagem, segundo o

Manual de análise sanitário de semente do MAPA (BRASIL, 2009). Cinco repetições de 50 g de sementes foram introduzidas em Erlenmeyers de 250 mL de volume, contendo 50 mL de água destilada, mais uma gota de o tenso ativo poli-oxi-etileno-sorbitano monolaurato (Tween 20, Sigma Chemical Co) e agitadas manualmente por cinco minutos. O líquido foi separado das sementes através de um coador. A suspensão foi dividida em cinco alíquotas de 10 mL em cinco tubos de ensaio e centrifugados (centrífuga ALPHA II), por dez minutos a 3.000 revoluções por minuto. O sobrenadante foi eliminado com uma pipeta, restando o precipitado. Foi adicionado 1,0 mL de água destilada e esterilizada em cada tubo e, agitado para resuspende o precipitado. As suspensões dos cinco tubos foram transferidas para um único tubo com um volume final de cinco mL. Com o auxílio de um micropipetador, foram depositados 10 µL numa lâmina de microscopia e feita à contagem em microscópio óptico. Utilizaram-se cinco repetições de cinco gotas por amostra. Os dados foram expressos como número de conídios de *Et* por semente.

2.2.3 Confirmação do agente causal

2.2.3.1 Caracterização morfológica

No isolamento do agente causal, foram pipetados 350 µL da suspensão dos conídios removidos das sementes por lavagem, para placas de petri contendo meio semi-seletivo LCHA modificado. Com o auxílio de uma alça de Drigalsky, distribui-se homogeneamente a suspensão na superfície do meio e incubou-se a 25±2 °C, no escuro,

por 15 dias, após transferiu-se parte da colônia jovem do fungo para tubos de ensaio contendo meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) e armazenados na micoteca, em refrigerador a 5°C.

A caracterização morfológica dos conídios foi realizada após a montagem de lâminas individuais dos isolados do fungo feitos das sementes infectadas. Com o auxílio de uma agulha histológica flambada, retiraram-se pequenas porções da colônia, com quinze dias de crescimento em meio LCHA, depositando-se sobre uma lâmina contendo uma gota de lactofenol e, sobre estas, uma lamínula. Foi determinado o comprimento, a largura e o número de septos de 50 conídios por lâmina, em microscópio óptico, aumento de 400x observando-se quatro repetições.

2.2.3.2 Prova de patogenicidade

Foi utilizada a mesma metodologia descrita anteriormente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Obtenção de meio semi-seletivo para *Exserohilum turcicum*

O meio selecionado para a detecção de *Et* em sementes do milho consta das seguintes concentrações em mg/L: carbendazim 60; captana 30; sulfato de neomicina 600 e sulfato de estreptomicina 500, adicionados ao meio LCHA, sendo denominado de meio semi-seletivo de De Rossi & Reis.

O meio de De Rossi & Reis, foi o mais sensível para a detecção de *Et* em sementes de milho inoculadas artificialmente (Tabela 1). Nos dois híbridos testados com esse meio, obteve-se a maior incidência de sementes infectadas, média de 57%, sendo de 26% no híbrido Celeron, e de 88% no híbrido P1630.

Tabela 1. Incidência (%) e germinação (%) de *Exserohilum turcicum* em sementes inoculadas artificialmente de dois híbridos de milho em três meios semi-seletivos

Meio	Híbrido				
	Celeron		P1630		Média Incidência (%)
	Incidência (%)	Germinação (%)	Incidência (%)	Germinação (%)	
LCHA	7b	73a	54b	88a	30,5
De Rossi & Reis	26a	85a	88a	77ab	57
Reis	22a	85a	34b	65b	28
Media	18,3	81	58,7	76,7	38,5
CV (%)	35,8	12,5	15,6	12,7	15

Cada amostra com quatro repetições de 25 sementes.

Médias da repetição de três experimentos, totalizando 300 sementes analisadas.

O meio de LCHA e o meio de Reis, também possibilitaram detecção do fungo em sementes infectadas artificialmente, mas com valores estatisticamente menores do que em meio de De Rossi & Reis. No meio de LCHA houve a ocorrência de contaminantes que dificultaram a avaliação. No meio de Reis foi necessário mais tempo para a detecção de *Et*, quando em LCHA ou em meio de De Rossi & Reis necessitam-se de 7 a 10 dias, no meio de Reis de 12 a 15 dias. Essa detecção em menor tempo pode ser explicada pelo fato de que o médio LCHA (base do meio de De Rossi & Reis) é indicado para fomentar a esporulação de *Et* (TUIITE, 1969).

Estes dados coincidem com vários experimentos prévios que foram realizados. Assim como se pode observar nos resultados da detecção e quantificação da infestação natural de *Et* em sementes de milho, onde esse meio foi o mais sensível para a detecção de *Et* em sementes *naturalmente* infectadas.

Não foi feita a comparação entre as incidências dos híbridos porque elas são dependentes de suas características intrínsecas (dureza da semente, composição, tempo de embebição necessário, etc.), o que determina porcentagens de incidência diferentes, média de 18,3% no híbrido Celeron e média 57,6% no híbrido P1630.

O fungo *Et* cresce melhor nos meio de LCHA e de De Rossi & Reis quando é colocado no escuro. Por isso, em próximos estudos visando a detecção de *Et* em sementes, poderia ser utilizada a mesma metodologia, mas sempre no escuro.

3.2 Detecção e quantificação da infecção natural de *Exserohilum turcicum* em sementes de milho e milho-pipoca

3.2.1 Detecção de *Exserohilum turcicum*

Foi detectado *Et* infectando naturalmente sementes de milho e sementes de milho-pipoca (Tabela 2), confirmado pela sua caracterização morfológica e prova de patogenicidade.

Os métodos de papel filtro com congelamento e meio de BDA, métodos utilizados rotineiramente nos laboratório de sementes em análise sanitária, demonstraram não ter sensibilidade suficiente para detectar o fungo. O meio de Reis, utilizado para a determinação de

fungos de parede obscura como *B. sorokiniana*, também não foi eficiente.

No entanto, a detecção foi comprovada no meio LCHA (TUIE, 1969) meio indicado para estimular a esporulação de *Et*, com uma incidência média de 0,016 %. Mas a utilização desse meio melhorado (DE ROSSI & REIS) foi o mais sensível para detectar *Et* em semente de milho e de milho pipoca, com uma média de detecção de 0,12 % de incidência.

Tabela 2. Incidência (%) da infecção natural de *Exserohilum turcicum* em sementes de milho e milho-pipoca em cinco métodos de detecção

Amostra	Método/Meio				
	Papel de filtro	BDA	Reis	LCHA	De Rossi & Reis
AG 8011 YG	0	0	0	0	0
Celeron TL	0	0	0	0	0
DKB 390	0	0	0	0	0
Exp 3949	0	0	0	0	0,08
P1630 (Erechim)	0	0	0	0	0,92
P1630 (Passo Fundo)	0	0	0	0,08	0,16
P32R22	0	0	0	0	0
Pipoca I (P625)	0	0	0	0,08	0,08
Pipoca II (sem nome)	0	0	0	0	0
Pipoca III (sem nome)	0	0	0	0	0
Média	0	0	0	0,016	0,124

Cada amostra com quatro repetições de 100 sementes.

Médias da repetição de três experimentos, totalizando 1.200 sementes analisadas.

A maior incidência foi determinada na amostra do híbrido P1630 (Erechim) com 0,92 % no meio de De Rossi & Reis. Utilizando o mesmo meio, nas amostras Exp 3949 e Pipoca I (P625) apresentaram uma semente infectada das 1.200 analisadas, sendo assim a incidência de 0,08 %, sendo que a amostra P1630 (Passo Fundo) apresentou 0,16 % de incidência (duas sementes apenas em 1.200 analisadas).

Com o meio LCHA foi possível detectar a infecção do fungo nas amostras P1630 (Passo Fundo) e Pipoca I (P625), ambas com 0,08 % de incidência.

As incidências do fungo *Et* nas semente são consideradas baixas (de 0,08 % a 0,92 %), sendo que nas amostras aonde foi detectado, apresentaram, em repetições dos experimentos, valores de zero.

As baixas incidências determinadas, não poderiam ser detectadas com os métodos utilizados rotineiramente (papel filtro com congelamento e BDA) por não serem sensíveis para a detecção deste patógeno. Esta pode ser a principal dificuldade pela qual não foi encontrada nenhuma referência, na literatura consultada, sobre a presença de *Et* infectando sementes de milho.

Os manuais para análise sanitária de sementes de milho do CIMMYT (WARHAM et al., 2002) e do MAPA (BRASIL, 2009), apresentam a possibilidade da presença de *Et* em sementes de milho, baseados no texto “Identificação das espécies de *Drechslera* em sementes” de CHIDAMBARAM et al. (1979), onde os pesquisadores citam a presença do fungo *Drechslera turcica* (sinônimo de *E. turcicum*) em milho e outras espécies, referindo-se a presença do

patógeno em sementes de *Sorghum bicolor* (L.) Moench. e *S. vulgare* Pers., não em milho.

Na Pennsylvania, Estados Unidos, Chilton (1940), determinou a ocorrência de *Helminthosporium turcicum* em sementes e glumas de *Sorghum vulgare* [*Sorghum bicolor*] var. *sudanense* [*S. sudanense*.]

A ISTA, Associação Internacional de Testes de Sementes (MACHADO et al., 2002), determina a utilização de 400 sementes em quatro repetições de 100 sementes para realizar análise sanitária. Essa quantidade de sementes para um fungo com incidência baixa é insuficiente, sendo que foi necessária a repetição de três vezes o determinado pela ISTA, para se obter valores numéricos.

Semelhantemente a *Et* em milho, poucos relatos foram encontrados na literatura sobre a incidência de *Septoria tritici* Desm. e *Septoria glycines* Hemmi em sementes de trigo e soja, respectivamente, estes fungos raramente são considerados como patógenos de sementes. Segundo Wiese (1977), o fungo *S. tritici* é raramente transmitidos pela semente, o único trabalho encontrado na literatura consultada, foi o de Paul et. al (1994), tendo detectado 0,3 a 1,3 % de incidência na semente de trigo. Segundo Hartman et al. (1999), *S. glycines* infecta sementes, mas trabalhos com valores que quantifiquem a incidência, com números, também não foram achados. Certamente, devido à sua baixa incidência e disponibilidade de métodos/meios com baixa sensibilidade, é que estes fungos não foram descritos claramente na literatura como veiculados por sementes. Provavelmente, a escassez ou inexistência de dados comprobatórios, possa ser atribuída aos métodos pouco sensíveis usados. Disso se infere da necessidade de mais pesquisa nesses patossistemas.

Em milho, o mesmo acontece com a mancha cinzenta causada por *Cercospora zeae-maydis* Tehon & Daniels, a qual ainda não tem sido citada como capaz infectar sementes de milho (McGEE, 1988; RICHARDSON, 1990). Certamente por isso, é que os manuais para análise sanitária de sementes de milho do CIMMYT (WARHAM et al., 2002) e do MAPA (BRASIL, 2009), apresentam, além de métodos de detecção de patógenos, métodos de detecção específicos dependendo do patógeno. É fundamental a disponibilidade de métodos sensíveis que permitam detectar e quantificar o inóculo nas sementes, mesmo com incidência baixa.

Pesquisadores que detalharam o ciclo de vida do *Et*, como Luttrell (1958), Boosalis et al. (1967), White (1999), Pingali (2000) e Lipps & Mills (2002), não fizeram referência a sua presença, ou o não, em sementes de milho.

A helminstosporiose do milho, no momento em que foi realizado este trabalho, não foi uma doença que se apresentava com alta intensidade na região de onde as amostras foram obtidas (Rio Grande do Sul). Por isso levanta-se a hipótese de que trabalhos semelhantes devem ser realizados em regiões com alta intensidade da doença, como na região de Córdoba, Argentina.

Na mesma região em que este trabalho foi conduzido, outros pesquisadores não determinaram a presença de *Et* em sementes de milho, esses trabalhos foram realizados sem meio/métodos semi-seletivos, como o realizado por Nerbass et al. (2008), onde avaliaram a sanidade de 224 amostras de sementes de milho, sendo 150 provenientes de Santa Catarina e 74 do Rio Grande do Sul, sendo os fungos identificados em meio BDA e utilizando 100 sementes por

amostras: *Acremoniella* spp., *Alternaria* sp., *Aspergillus flavus* (Link.), *A. niger* (Tieghem.), *Bipolaris* sp., *Cephalosporium* (Corda.), *Curvularia* sp., *Fusarium verticillioides* (Sacc.), *Fusarium* sp., *Nigrospora* sp., *Penicillium* spp. (Link.), *Rhizopus* sp., *Rhizoctonia* sp., *Stenocarpella maydis* (Berk.) e *Trichoderma* sp.

3.2.2 Identificação e caracterização do agente causal

Quanto às características morfológicas de largura e de comprimento, obtidas por meio das mensurações de 200 conídios, os esporos mediram 10,0-22,5 x 47,5-110,1 µm, apresentando 2-8 septos por conídio. Os valores obtidos de largura e comprimento ficaram próximos das mensurações descritas por Ellis (1971), de 18-32 x 50-144 µm, mas variaram quanto ao número de septos, onde Ellis cita entre 4-9 septos. Segundo Shurtleff (1992), os conídios apresentam tamanho 20 x 105 µm e entre 3 e 8 septos por conídio. Os valores relatados por Shurtleff ficaram ainda mais aproximados aos determinados neste trabalho.

3.2.3 Patogenicidade

Uma semana após a inoculação do patógeno nos cartuchos das plantas do milho do híbrido suscetível P1630, observou-se as primeiras lesões folhares de formato elíptico e alongado de cor verde-acinzentadas, coincidentes com o registrado por ELLIOT & JENKINS (1946) e por BACH & KIMATI (1995). Aos 15-21 dias todas as plantas inoculadas apresentaram sintomas característicos da

helminthosporiose do milho. Os resultados positivos das inoculações confirmaram a patogenicidade dos isolados obtidos das sementes infectadas de *Et* em milho e milho pipoca.

3.3 Detecção e quantificação da infestação de *Exserohilum turcicum* em grãos de milho

3.3.1 Detecção de *Exserohilum turcicum*

O fungo *Et* foi detectado infestando grãos de milho com uma média de 0,51 conídios/10 µL, correspondendo a 1,04 conídios por semente (Tabela 3). A maior quantidade de conídios por grãos determinada foi de 1,33 e a menor de 0,65.

Tabela 3. Infestação de grãos de milho P1630, com conídios de *Exserohilum turcicum*

Repetição	Conídios/10 µL (n°)	Grãos/50 gr (n°)	Conídios/grãos (n°)
I	0,56	193	1,16
II	0,56	190	1,17
III	0,68	203	1,33
IV	0,32	197	0,65
V	0,44	192	0,91
Média	0,51	195	1,04

3.3.2 Identificação e caracterização do agente causal

Quanto às características morfológicas de largura e de comprimento, obtidas por meio das mensurações de 200 conídios, os esporos mediram na média 10,7-25,0 x 43,5-138,7 μm , apresentando 2-8 septos por conídio. Os valores obtidos de largura e comprimento foram próximas das mensurações descritas por Ellis (1971), de 18-32 x 50-144 μm , mas variaram quanto ao número de septos, onde Ellis cita entre 4-9 septos. Segundo Shurtleff (1992), os conídios apresentam tamanho 20 x 105 μm (não especificando os valores mínimos e os máximos) e entre 3 e 8 septos por conídio. Os valores relatados por Shurtleff ficaram ainda mais aproximados aos determinados neste trabalho.

3.3.3 Patogenicidade

Uma semana após a inoculação do patógeno nos cartuchos das plantas do milho do híbrido suscetível P1630, observou-se as primeiras lesões folhares de formato elíptico e alongado de cor verde-acinzentadas, coincidentes com o registrado por ELLIOT & JENKINS (1946) e por BACH & KIMATI (1995). Aos 15-21 dias todas as plantas inoculadas apresentaram sintomas característicos da helmintosporiose do milho.

Os resultados positivos das inoculações confirmaram a patogenicidade dos conídios de *Et* infestando sementes de milho.

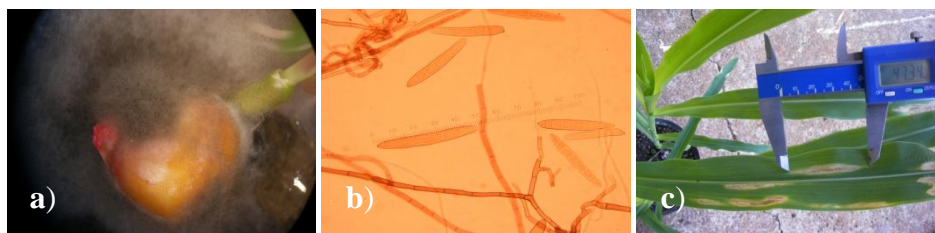


Figura 1: (a) semente com micélio e conídios, (b) conídios (c) lesões foliares de *Exserohilum turcicum* isolado de sementes de milho.

4. CONCLUSÕES

O meio semi-seletivo de DE ROSSI & REIS (2012) foi o meio mais sensível para a detecção de *Et* em sementes de milho.

Confirma-se a presença de *Et* infectando e infestando naturalmente semente de milho e de milho-pipoca. As dificuldades em sua detecção podem ser devidas a baixa incidência e aos métodos rotineiramente utilizados para sua detecção, pouco sensíveis.

Confirma-se, mediante isolamento, inoculação, caracterização morfológica e pela comparação com descrições da espécie disponíveis na literatura, que o fungo isolado de sementes pertence à espécie *Et*, agente causal da helmintosporiose do milho

CAPITULO III

QUANTIFICAÇÃO DA TRANSMISSÃO DE *Exserohilum turcicum* DE SEMENTES PARA ÓRGÃOS AÉREOS DO MILHO

ROBERTO LUIS DE ROSSI¹

RESUMO - As sementes se constituem no mais eficiente agente de disseminação e no mais seguro abrigo à sobrevivência dos fitopatógenos. A transmissão refere-se à passagem dos patógenos das sementes para os órgãos aéreos das plantas. Os objetivos deste trabalho foram (i) identificar metodologia para a inoculação artificial de sementes de milho com *Exserohilum turcicum* (*Et*) e (ii) utilizar as sementes infectadas para descrever e quantificar o processo de transmissão do inóculo da semente para os órgãos aéreos. Foram testados os métodos de inoculação de sementes pela exposição direta ao micélio do fungo crescente e pela imersão de sementes numa suspensão de conídios. As sementes foram retiradas em tempos estabelecidos, secadas e plaqueadas gerboxes contendo meio semi-seletivo de De Rossi & Reis, para detecção de *Et*. Foi avaliada a incidência de *Et* e a germinação das sementes. O método de infecção artificial das sementes de milho com *Et* com a exposição desta ao micélio do fungo foi eficiente para a infecção. Não foi possível

¹Engenheiro Agrônomo, mestrando do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de Concentração em Fitopatologia.

detectar o fungo em órgãos aéreos comprovando a transmissão de *Et* desde as sementes.

Palavras-chave: helmintosporiose, *Zea mays*, patologia de sementes

QUANTIFICATION *Exserohilum turcicum* TRANSMISSION FROM CORN SEEDS TO AERIAL PARTS

ABSTRACT - Seeds constitute the most efficient way of dissemination and a safer shelter for pathogen survival. The transmission refers to the passage of pathogens from seeds to the aerial organs of the plant. The artificial inoculation of seeds becomes a useful tool for research on seed pathology ensuring the reproduction of disease symptoms and its application in studies of pathogen detection, transmission and seedling control. The objectives of this study were (i) to identify a methodology for artificial seed inoculation with *Exserohilum turcicum* (*Et*) and (ii) to use the infected seeds to describe and quantify the pathogen transmission process from seeds to the aerial organs. We tested two methods for seed inoculation: (i) direct exposure to fungal growing mycelium and (ii) soaking in a spore suspension. In order to detect *Et*, seeds were collected at different times, dried and plated onto gerbox containing the semi-selective De Rossi and Reis medium. We evaluated *Et* incidence and seed germination. We succeeded in artificially infect corn and popcorn seeds by exposing them to *Et* mycelium. This methodology was then used to infect seeds for fungal transmission experiments conducted under controlled

conditions. Although we were unable to detect *Et* transmission from seed to aerial organs, it was possible to develop and apply an effective and easy method for in vitro seed inoculation.

Key-words: Northern leaf blight, *Zea mays*, *helminthosporium*

1. INTRODUÇÃO

Geralmente se considera que o milho foi uma das primeiras plantas cultivadas pelos agricultores há entre 7000 e 10000 anos. A mais antiga evidência de milho como alimento vem de alguns sítios arqueológicos, no México, onde algumas pequenas espigas de milho, de mais de 5000 anos estimados, foram encontradas em cavernas de povos primitivos (WILKES, 1979, 1985).

Muitos pesquisadores acreditam que o milho teria ser originado no México, onde o milho e o teosinto ter coexistido desde os tempos antigos e onde ambas as espécies possuem uma diversidade muito ampla (WHEATHERWAX, 1955; ILTIS, 1983; GALINAT, 1988; WILKES, 1989).

Smith (1995) cita que o inóculo na semente é responsável pelo transporte e disseminação dos patógenos necrotróficos dos órgãos aéreos dos hospedeiros, desde os centros de origem das espécies vegetais para todos os locais de cultivo no mundo.

As sementes se constituem no mais eficiente agente de disseminação e no mais seguro abrigo à sobrevivência dos patógenos. A disseminação passiva direta ocorre quando o patógeno se utiliza de órgãos ou de partes do hospedeiro para a sua sobrevivência e disseminação. Através dessa associação, os patógenos sempre acompanham os hospedeiros, deles não se separando, pois depende nutricional mente da planta cultivada. A associação dos patógenos às sementes garante o acesso direto do parasita à fonte nutricional por ocasião da germinação e emergência. Na natureza ocorre um processo cíclico, indefinido quanto à duração, de infecção da semente durante a

sua formação na lavoura e a posterior passagem, ou transmissão dos patógenos aos órgãos aéreos e radiculares do hospedeiro. Nesta ocasião reinicia-se a fase parasitária, a qual é prejudicial à planta (REIS & CASA, 1998).

Conforme Reis & Casa (1998), através do veículo semente, os patógenos são levados a distâncias consideráveis, como de um estado ou país para outro, no processo de comercialização. A semente também reintroduz o patógeno nas lavouras em que se pratica a rotação de culturas.

A transmissão de patógenos refere-se à passagem dos patógenos das sementes para os órgãos aéreos das plantas. Durante o processo de germinação da semente, o micélio que se encontrava no pericarpo ou no endosperma reassume o seu crescimento, passando do interior à superfície da semente (LÂNGARO, 1998).

Por isso, a inoculação artificial de sementes torna-se uma ferramenta útil para o desenvolvimento de trabalhos de pesquisa em patologia de sementes. A inoculação deve garantir a reprodução da sintomatologia da doença e ainda possibilitar a sua aplicação em estudos de detecção (TANAKA & MENTEN, 1991), transmissão semente-plântula, controle e, principalmente, a quantificação do impacto do inóculo na semente transmitido aos órgãos aéreos, no desenvolvimento de epidemias em órgãos aéreos à partir desta fonte de inóculo.

A helmintosporiose do milho (*Zea mays* L.), causada por *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs, é uma das principais doenças do milho, causando nas últimas safras, importantes danos aos produtores da Argentina e do Brasil.

Tem sido timidamente afirmado que *Et* é transmitido por sementes, porém sem suporte numérico. Pesquisadores que detalham o ciclo de vida do *E. turcicum* (*Et*), como Luttrell (1958), Boosalis et al. (1967), White (1999), Pingali (2000) e Lipps & Mills (2002), não fizeram referência a sua presença, ou o não, em sementes de milho, portanto também não relatam a possibilidade de sua transmissão.

Comprovar cientificamente a transmissão do inóculo para os órgãos aéreos, resultando na introdução do fungo em novas áreas de cultivo, é um desafio. Segundo Reis & Casa (1998) esse processo é muito importante, pois garante a continuidade do ciclo vital dos patógenos, ao assegurar-lhes a fonte nutricional a seu crescimento e esporulação.

Os objetivos deste trabalho foram (i) identificar método adequado para a inoculação artificial de sementes de milho com *Et* e (ii) utilizar as sementes infectadas artificialmente para descrever e quantificar o processo de transmissão do inóculo da semente para os órgãos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia - Micologia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF (Universidade de Passo Fundo) durante os anos 2011 e 2012.

2.1 Amostras de sementes

Foram utilizadas sementes de milho P1630 e sementes de milho pipoca P625, artificialmente infectadas com o fungo *Exserohilum turcicum*.

2.1.1 Infecção artificial das sementes

2.1.1.1 Pre-embebição das sementes

Prévio a infecção das sementes, foi feita a pré-embebição para facilitar a penetração do patógeno na semente. As sementes foram distribuídas em caixas de acrílico, tipo gerbox de poliestireno cristal (11 x 11 x 3,5 cm de altura), com tampa. No fundo do recipiente foi colocada uma espuma de polietileno e, sobre esta, duas folhas de papel filtro. O material absorvente foi embebido com água destilada, até a saturação da espuma, constituindo uma câmara úmida. O material foi levado à câmara de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, no escuro, por 10 horas.

2.1.1.2 Infecção das sementes: método de exposição direta

Depois da pré-embebição, as sementes foram colocadas, com o escutelo para abaixo, sobre micélio de *Et* com 15 dias de crescimento em placas de petri, por 48 horas, no escuro. No término desse tempo foram retiradas e colocadas a secar na câmara de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C por outras 48 horas.

2.1.1.3 Infecção das sementes: método da imersão na suspensão de conídios

Após a pré-embibição, as sementes foram embebidas em cinco suspensões de conídios nas concentrações de 100, 500, 1000 e 5000 conídios/mL e logo colocadas em caixas tipo gerbox acondicionados como anteriormente descrito, por 48 horas, para que os conídios germinarem e penetrarem. No término desse tempo foram retiradas e colocadas a secar em câmara de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C por outras 48 horas.

2.2 Determinação da infecção

De cada amostra de semente infectada, quatro sub mostras de 25 sementes, foram plaqueadas em gerboxes contendo meio semi-seletivo de De Rossi & Reis, para detecção de *Et*, detalhado no Capítulo II. As sementes foram desinfestadas, antes do plaqueamento, imersas numa solução aquosa de hipoclorito de sódio a 1% por três minutos, após foram lavadas três vezes em água destilada para remover o resíduo do hipoclorito. A avaliação foi realizada após 7 a 10 dias de incubação, sob lupa estereoscópica com 50x de aumento, identificando a presença de micélio e/ou conídios de *Et* sobre as sementes.

2.3 Determinação da transmissão

2.3.1 Recipientes: caixas

Sementes infectadas pelo fungo foram semeadas em caixas com 30 cm de largura x 50 cm de comprimento e 10 cm de altura, contendo solo turfoso, oriundo de um local que a cultura do milho nunca havia sido cultivada. O substrato foi umedecido a capacidade de campo, 24 horas antes da semeadura.

As sementes infectadas artificialmente foram desinfestadas, antes da semeadura, imersas numa solução aquosa de hipoclorito de sódio a 1% por três minutos, após, foram lavadas três vezes em água destilada para remover o resíduo do hipoclorito.

Foram colocadas 50 sementes na profundidade de 2,0 cm. O experimento constituiu-se por quatro repetições para cada tratamento. As caixas foram colocadas em câmara climatizada com temperatura de 25 ± 2 °C e com fotoperíodo de 12 horas, durante 30 dias.

2.5.2 Recipientes: tubos de ensaios

Tubos de ensaio (N° 9820) foram utilizados para uma melhor visualização dos sintomas resultantes na transmissão do patógeno. Neles foram colocadas dez gramas de areia ou vermiculita, e umedecidos com solução nutritiva (Kristalalan marca YARA).

As sementes foram desinfestadas, antes da semeadura, imersas numa solução aquosa de hipoclorito de sódio a 1% por três minutos, após foram lavadas três vezes em água destilada para remover o resíduo do hipoclorito e semeadas a profundidade de 2,0 cm em cada tubo.

O experimento foi constituído por três repetições de quatro tubos para cada tratamento. Os tubos foram colocados em câmara

climatizada com temperatura de 25 ± 2 °C e com fotoperíodo de 12 horas, durante 21 dias.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Infecção das sementes: método de exposição direta

O método de inoculação de sementes por pré-embebição de dez horas e a exposição das sementes por 48 h sobre a colônia de *Et* em placas de petri (prévio pré embebição), mostrou-se eficiente para infectar sementes de milho e milho-pipoca (Tabela 1).

Tanaka & Menten (1991) e Machado et al. (2001) discutem que, por este método (exposição sobre micélio), os fungos, em sua maioria, ficam, aderidos ao tegumento das sementes; dessa maneira, o processo de infecção não é assegurado, em níveis satisfatórios, mas sim apenas a contaminação superficial das sementes.

Machado et al. (2001) desenvolveram uma metodologia de inoculação de sementes de milho por meio da tecnologia de restrição hídrica para os fungos *Diplodia maydis*, *Cephalosporium acremonium* e *Fusarium moniliforme*. Os autores citam que, sem a hidratação das sementes, não ocorre a infecção por fungos. Além disso, outro fator limitante é o tempo de exposição das sementes à colônia do fungo, visto que as sementes podem iniciar o processo de germinação em curto período de tempo, dependendo da espécie avaliada.

O sucesso obtido no presente trabalho, com a infecção artificial por meio do contato direto das sementes com o fungo crescido em meio BSA sem restrição hídrica, pode ser explicado pelo período de

pré-embebição utilizado. Obteve-se nas sementes de milho P1630 uma média de germinação de 70,25% com 78,3% infectadas por *Et* (Figura 1). No milho-pipoca houve uma germinação menor (47,5%), tendo a testemunha apresentando baixa germinação (67,5%), e 27,2% de sementes infectadas.

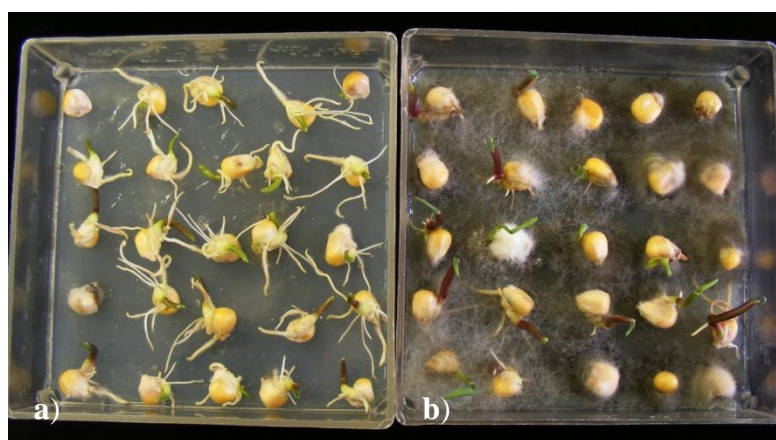


Figura 1. Incidência de *Exserohilum turcicum* em sementes de milho infectadas artificialmente pelo método de exposição direta sobre micélio. a) testemunha b) semente infectada artificialmente (micélio escuro de *Exserohilum turcicum*).

Embora a alta incidência obtida nas sementes, não foi possível determinar a transmissão de *Et* para órgãos aéreos, tanto nas caixas com substrato como nos tubos de ensaios com areia e vermiculita.

Nos testes de transmissão foi observado que as plântulas infectadas artificialmente apresentavam sintomas de clorose, necrose, deformações e menor desenvolvimento que as testemunhas (Figura 2), mas não foi detectada a presença de esporulação de *Et*. Essa sintomatologia pode ser causada pelas toxinas que possui *Et*. Segundo Bach et al. (2005), as toxinas do fungo *Et* retardam o desenvolvimento

de plântulas. Os mesmo autores demonstraram que, em folhas destacadas de variedades suscetíveis, as toxinas isoladas de milho induziram a necrose (como na formação das lesões) e, nas variedades resistentes, apenas clorose.

No campo foram estabelecidos dois experimentos com dois tratamentos: sementes infectadas artificialmente, pelo método da exposição direta sobre micélio, e sementes sem infecção artificial (testemunha). Mas não se obteve sucesso nos dois experimentos.

Tabela 1. Germinação (%), infecção artificial (%) e transmissão (%) de sementes de milho e milho pipoca infectadas artificialmente com *Exserohilum turcicum* pelo método da exposição direta sobre micélio

Material	Germinação (%)	Infecção (%)	Transmissão (%)		
			Em caixas com solo	Em tubos com areia	Em tubos com vermiculita
P1630	70,2	78,3	0	0	0
P625 (pipoca)	47,5	27,2	0	0	0
Testemunha P1630	89,0	0	0	0	0
Testemunha pipoca	67,3	0	0	0	0

Media de quatro repetições de 25 sementes.
O experimento foi repetido três vezes.

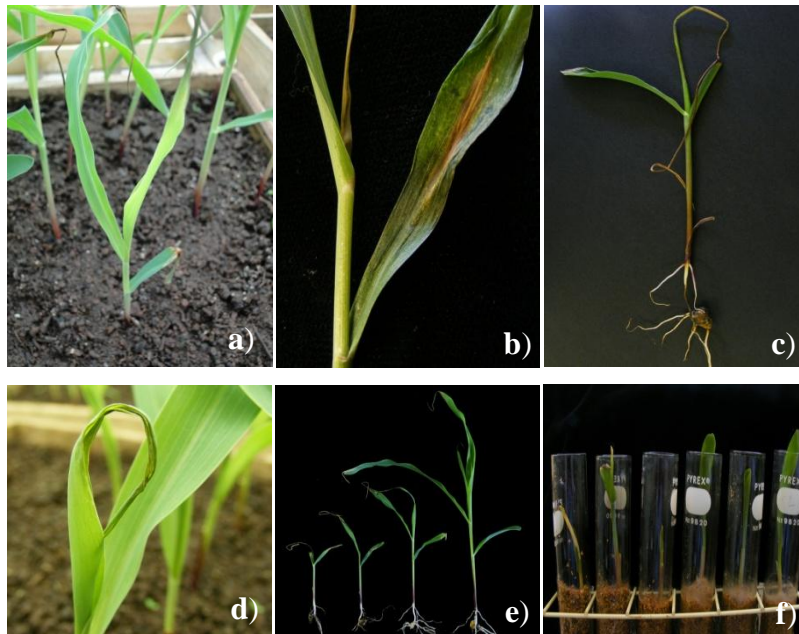


Figura 2. Sintomas em plântulas de milho a partir de sementes inoculadas com *Exserohilum turcicum*. a), b), c), d), e): crescendo em caixas com solo turfoso; f): crescendo em tubos de ensaio com areia.

3.2 Infecção das sementes: método da imersão na suspensão de conídios

O método de infecção de sementes de milho pela imersão numa suspensão de conídios mostrou-se ineficiente em infectar sementes de milho e milho-pipoca (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2. Infecção de sementes de milho com quatro concentrações de conídios/mL de *Exserohilum turcicum*

Material	Concentração (Conídios/mL)	Infecção (%)
P1630	100	0
P1630	500	0
P1630	1.000	0
P1630	5.000	0
P625 (pipoca)	100	0
P625 (pipoca)	500	0
P625 (pipoca)	1.000	0
P625 (pipoca)	5.000	0

Media de quatro repetições de 25 sementes.

O experimento foi repetido duas vezes.

Tabela 3. Germinação (%), infecção (%) e transmissão (%) de sementes de milho e de milho-pipoca infectadas artificialmente com *Exserohilum turcicum* pela imersão em suspensão de conídios

Material	Germinação (%)	Infecção (%)	Transmissão (%)		
			Em caixas com solo	Em tubos com areia	Em tubos com vermiculita
P1630	90,4	0	0	0	0
P625 (pipoca)	68,9	0	0	0	0
Testemunha P1630	93,0	0	0	0	0
Testemunha pipoca	70,3	0	0	0	0

Media de quatro repetições de 50 sementes.

O experimento foi repetido duas vezes.

O processo de infecção artificial com suspensão de conídios, ao ser menos invasivo, quando comparado com o processo de infecção pela deposição sobre micélio, resultou em melhor percentagem de germinação, mas não foi possível obter sementes infectadas.

A partir da importância das sementes na disseminação e epidemiologia das doenças do milho, se faz necessário conduzir novas pesquisas, no que se refere à detecção da transmissão deste patógeno de milho. Nelas deveram-se explorar as diferenças entre híbridos, a influência da temperatura, da idade da planta, do molhamento e da umidade relativa.

4. CONCLUSÕES

Se obtive sucesso na infecção artificial das sementes de milho com *Et* com a metodologia da deposição da semente sobre micélio do fungo.

Não se detectou o fungo nos órgãos aéreos de plântulas de milho.

Ainda há a necessidade de mais pesquisa para a quantificação da transmissão de *Et* de sementes aos órgãos aéreos do milho, do que se refere aos componentes ou variáveis que interferem na taxa da transmissão.

CAPITULO IV

SENSIBILIDADE MICELIANA *IN VITRO* DE *Exserohilum turcicum* A FUNGICIDAS

ROBERTO LUIS DE ROSSI¹

RESUMO - A helmintosporiose do milho, causada por *Exserohilum turcicum* (*Et*), é uma das principais doenças do milho, podendo afetar significativamente o rendimento e sua qualidade. Visando seu manejo integrado, é necessário realizar a combinação de diferentes medidas de controle, uma delas é a quimioterapia. O objetivo deste trabalho foi determinar a sensibilidade miceliana de dez isolados de *Et*, cinco da Argentina e cinco do Brasil, a seis fungicidas utilizados para tratamentos de sementes. Foi determinada a concentração inibitória (CI_{50}), mediante a utilização de sete concentrações dos fungicidas que foram comparadas no bioensaio 0,00; 0,01; 0,10; 1,00; 10,00; 25,00 e 50,00 mg/L de ingrediente ativo (i.a.), suplementadas ao meio agarizado. O diâmetro do crescimento miceliano foi medido com paquímetro digital. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições. Os dados da porcentagem de inibição do crescimento miceliano, foram submetidos à análise de regressão logarítmica e calculada a CI_{50} . O ingrediente ativo iprodiona, apresentou-se como o mais potente para o controle de *Et*, com uma

¹Engenheiro Agrônomo, mestrando do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de Concentração em Fitopatologia.

CI₅₀ menor do que 0,01 mg/L, seguido pelo fludioxonil, com CI₅₀ média de 0,31 mg/L, e tiram, com CI₅₀ de 1,37 mg/L. Os fungicidas carbendazim, metalaxil e captana foram classificados como não fungitóxicos a *Et*, já que as CI₅₀ determinadas para os três ingredientes ativos foram superiores a 50 mg/L para todos os isolados. Os resultados obtidos neste trabalho, quanto a CI₅₀, podem ser utilizados como valores de referência para próximos estudos.

Palavras-chave: *Zea mays*, helmintosporiose, fungitoxidade, tratamento de sementes, CI₅₀

***IN VITRO* MYCELIAL SENSITIVITY OF *Exserohilum turcicum*, ISOLATED FROM CORN TO FUNGICIDES**

ABSTRACT - The Northern blight of corn, caused by *Exserohilum turcicum* (*Et*), is one of the major diseases of maize that might significantly affect crop production and quality. For good integrated yield management it is necessary to combine different control measures such as chemotherapy. The aim of this work was to determine the sensibility of ten *Et* isolates (five from Argentina and five from Brazil) to six fungicides employed in seed treatment. It was determined the inhibitory concentration, IC₅₀, in agar plates supplemented with seven different concentrations of the active ingredients (ai): 0.00, 0.01, 0.10, 1.00, 10.00, 25.00 and 50.00 mg/l. The diameter of the mycelium was measure with a digital caliper. The experimental design was completely randomized with four

replications. The mycelium growth percentages were analyzed by logarithmic regression and the IC_{50} calculated. Iprodione was the most potent active ingredient for controlling *Et* with an IC_{50} lower than 0.01 mg/l, followed by fludioxonil with a mean IC_{50} of 0.31 mg/l and thiram with IC_{50} of 1.37 mg/l. The fungicides carbendazin, metalaxyl and captan were classified as non fungitoxic, since the IC_{50} obtained were greater than 50 mg/l for all the isolates. Although iprodione is not usually used in maize seed treatment formulations, it produced the greater inhibition of *Et* growth in vitro. As a conclusion, IC_{50} results could be used as reference values for futures studies on *Et* development.

Key-words: Northern leaf blight, *Zea mays*, helminthosporium, fungitoxicity, seed tratament, IC_{50}

1. INTRODUÇÃO

As doenças de plantas representam um dos fatores de maior risco para a agricultura, comprometendo a produção em muitas culturas, causando, em escala mundial, prejuízos para produtores e consumidores. Entre os patógenos que causam doenças, nas diversas culturas, os fungos são responsáveis com 81,5% do total (POZZA et al., 1999).

Uma das principais doenças foliares do milho é a helmintosporiose ou queima da folha do milho, causada por *Exserohilum turcicum* (Et) Leonard & Suggs (sinom. *Helminthosporium turcicum* Pass) [teleomorfo *Setosphaeria turcica* (Lutterell); sinon. *Trichometasphaeria turcica* Lutterell Leonard & Suggs (FREDERIKSEN, 1991).

Epidemias esporádicas ocorrem mais freqüentemente nas regiões sul e oeste do Brasil onde causam danos severos no rendimento de grãos (ESTEVES, 1989). Os danos podem ser de até 50% (RAYMUNDO & HOOKER, 1981).

Dependendo das condições ambientais, a queima das folhas do milho, pode afetar significativamente a produção e sua qualidade, principalmente, quando a infecção coincide com a época de floração (ULLSTRUP, 1970; BALMER, 1980).

A sensibilidade de um fungo a uma determinada substância tóxica é quantificada pela DE (dose efetiva) ou CE (concentração efetiva) ou CI (concentração inibitória). A CI_{50} se refere à concentração da substância que inibe 50% do crescimento miceliano

ou da germinação de esporos potencialmente viáveis (REIS et al., 2010).

Valores de CI_{50} , para diferentes fungicidas e específicos a *Et* em milho, tanto para tratamentos em sementes como para tratamentos foliares, podem ser úteis na condução de trabalhos de pesquisa e no manejo da doença.

O objetivo deste trabalho foi determinar *in vitro*, a sensibilidade miceliana de isolados de *Et* e gerar valores de CI_{50} para diferentes fungicidas utilizados no tratamento de semente de milho.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia - Micologia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo (UPF), RS.

2.1 Isolados de *Exserohilum turcicum*

A coleção de isolados de *Et*, utilizados nos ensaios, foi obtida a partir de isolamentos monospóricos, feitos a partir de folhas com sintomas da doença, coletadas em cinco lavouras de milho oriundas da província de Córdoba, Argentina, e cinco amostras do estado do Rio Grande do Sul, Brasil, todas obtidas no ano 2011 (Tabela 1).

Culturas puras dos isolados foram preservadas em tubo de ensaio com meio de batata dextrose ágar desidratado (marca MERCK, 39 g/L), em refrigerador á temperatura de 5 °C.

Tabela 1. Identificação de isolados monospóricos de *Exserohilum turcicum*, de milho

País	Cultivar	Denominação
Argentina	AW 190 MGRR2	01-AR
Argentina	DK 670 MG	02-AR
Argentina	DK 747 MGRR2	03-AR
Argentina	NK 910 TD Max	04-AR
Argentina	P31Y05 H	05-AR
Brasil	AG 9045 convencional	01-BR
Brasil	AG 8011 Pro	02-BR
Brasil	AG 9010 Pro	03-BR
Brasil	DKB 350 Pro	04-BR
Brasil	AG 8025 H	05-BR

2.2 Fungicidas

Na avaliação do crescimento miceliano quanto á sensibilidade de isolados de *Et*, foram selecionados seis fungicidas, cinco deles utilizados para tratamentos de sementes de milho: captana, carbendazim, fludioxonil, metalaxil e tiram (INDICAÇÕES, 2009), e a iprodiona, de conhecida ação contra fungos de paredes escuras, como *Bipolaris sorokiniana* (Sacc. in Sorok), utilizado no tratamento de sementes de trigo.

Fungicidas (nome técnico, nome comercial, ingrediente ativo (g/L), grupo químico): i) captana, Captan, 480, dicarboximida; ii) carbendazim, Derosal, 500, benzimidazol; iii) iprodiona, Rovral, 500, dicarboximida; iv) fludioxonil, Maxim, 250, fenilpirrol; v) metalaxil,

Apron XL, 350, acilalanina; vi) tiram, Rhodiauram, 659, dimetilditiocarbamato (AGROFIT, 2012).

2.3 Determinação *in vitro* da sensibilidade micelial a fungicidas

Para a avaliação do crescimento miceliano, quanto à sensibilidade de isolados de *Et*, utilizou-se o método de incorporação de fungicidas ao meio de cultura fundente, semelhante ao método descrito por Russel (2004).

Sete concentrações dos fungicidas foram utilizadas nos ensaios: 0,00; 0,01; 0,10; 1,00; 10,00; 25,00 e 50,00 mg/L de ingrediente ativo de cada fungicida. A concentração 0,00 mg/L, ou ausência de fungicida, representou a testemunha do experimento.

Essas concentrações foram obtidas através da diluição a partir de suspensões estoque dos fungicidas. Para sua obtenção, os mesmos foram suspensos em água destilada e esterilizada (ADE).

As suspensões finais foram preparadas em Erlenmeyers, adicionando-se os volumes necessários das suspensões estoques ao meio de cultura de batata dextrose ágar desidratado (BDAD) (marca MERCK, 39 g/L) requeridos para cada concentração.

Após a esterilização do material em autoclave, em câmara de fluxo laminar em condições assépticas, prepararam-se as suspensões estoques em balões volumétricos contendo ADE, mais a suspensão fungicida, resultando em um volume final de 100 mL (suspensão estoque1). Desta primeira suspensão fungicida, transferiu-se 1 mL para 99,0 mL de ADE para outro balão volumétrico, constituindo a segunda diluição (suspensão estoque2).

Após o preparo das soluções acrescentaram-se os volumes necessários ao meio de cultura para que as concentrações desejadas fossem satisfeitas. Utilizou-se a solução estoque 1 para obter as concentrações altas (10,0; 15,0 e 50,0 mg/L) e a estoque 2 para as concentrações baixas (0,01; 0,1; 1,0 mg/L). Os frascos foram cuidadosamente agitados e os meios vertidos em placas de petri plásticas (tamanho 60 x 10 mm) previamente esterilizadas, em câmara de fluxo laminar em condições assépticas.

Para as placas de petri contendo substrato suplementado com as concentrações dos fungicidas, transferiram-se discos de micélio de cada isolado de *Et*, com 4 mm de diâmetro, retirados de colônias com 15 dias de crescimento. Os discos foram colocados no centro das placas, com o lado superior em contato com o substrato. As placas foram vedadas com papel filme de PVC e incubadas na câmara de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, no escuro.

2.4 Avaliação

A avaliação foi realizada com o auxílio de um paquímetro digital (marca Mitutoyo, modelo 500-143B), medindo-se o diâmetro das colônias em dois sentidos perpendiculares, quando o crescimento do fungo, no tratamento testemunha, atingiu à borda da placa.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial (fungicida x isolado) constituído de sete tratamentos e quatro repetições, cada unidade experimental representada por uma placa de petri. Os experimentos foram realizados duas vezes para

garantir a precisão dos dados, utilizando na análise estatística a média dos dois experimentos.

Os resultados da mensuração do diâmetro das colônias em milímetros foram transformados para percentagem de inibição de crescimento miceliano de *Et* para cada tratamento em relação à testemunha, e realizou-se a análise de regressão logarítmica, utilizando o programa estatístico InfoStat (DI RIENZO, 2010) e o programa Microsoft Excel. A concentração inibitória capaz de inibir 50% do crescimento miceliano (CI_{50}) do fungo para os fungicidas comparados e para cada isolado de *Et* foi calculada a partir da equação gerada.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Poucos são os trabalhos, na literatura consultada, sobre a eficácia do controle químico nesse patossistema, principalmente em relação a tratamento de sementes.

A fungitoxicidade dos fungicidas comparados neste trabalho, para as duas vezes em que o experimento foi realizado (médias), para o crescimento miceliano encontra-se nas Tabelas 2-7, e representados graficamente na Figura 1.

A sensibilidade dos isolados aos fungicidas testados foi classificada tomando-se como padrão os critérios de Edgington & Klew (1971). No presente trabalho foi adaptada, segundo os seguintes atributos: insensível (I) se a $CI_{50} > 50$ mg/L; baixa sensibilidade (BS) se a CI_{50} estiver entre 10 e 50 mg/L; moderadamente sensível (MS) se a CI_{50} estiver entre 1 e 10 mg/L; altamente sensível (AS) se a $CI_{50} < 1$ mg/L.

A sensibilidade média dos dez isolados foi classificada como: insensíveis (I) para os fungicidas captana, metalaxil e carbendazim, moderadamente suscetível (MS) para o tiram, e como altamente sensíveis (AS) para os fungicidas iprodiona e fludioxonil (Tabela 8).

Os resultados que se apresentam são das medias de dois experimentos, mas para ter certeza da insensibilidade foram realizadas mais repetições. O experimento com o fungicida carbendazim foi repetido três vezes, mais duas repetições das três concentrações maiores. Os experimentos com os fungicidas metalaxil e captana foram repetidos três vezes completos, mais uma repetição das três concentrações maiores.

O ingrediente ativo captana (Tabela 2) foi o único que apresentou variação entre os isolados. O isolado 02-AR, foi o mais sensível para esse ingrediente ativo com uma CI_{50} de 3,96 mg/L, classificando-se como moderadamente sensível. Os isolados 03-AR e 05-BR foram classificados como de baixa sensibilidade, apresentando CI_{50} de 41,65 mg/L e 10,54 mg/L respectivamente. Os demais isolados apresentaram CI_{50} superiores a 50 mg/L, sendo classificados como insensíveis. Pela média da CI_{50} para os dez isolados *Et* foi classificado como insensível ao fungicida captana. Para os isolados 01-AR, 03-BR e 04-BR, não foi possível obter valores numéricos, já que o fungo não foi inibido na máxima concentração, não sendo gerada a regressão e determinada a CI_{50} (não significativos).

Não houve variações entre os isolados para os princípios ativos iprodiona, metalaxil, fludioxonil, carbendazim e tiram.

Os fungicidas carbendazim (Tabela 2), metalaxil (Tabela 3), e captana (Tabela 4) foram classificados como não fungitóxicos a *Et*, já

que as CI_{50} determinadas para os três ingredientes ativos foram superiores a 50 mg/L para todos os isolados (carbendazim: $r^2=0,87$; $p=0,02$ – metalaxil: $r^2=0,71$; $p<0,01$ – captana: $r^2=0,61$; $p=0,01$).

Para o princípio ativo tiram (Tabela 5), foi determinada a CI_{50} de 1,37 mg/L (mínima de 1,10 mg/L e máxima 1,97 mg/L), como média dos dez isolados ($r^2=0,86$; $p<0,01$), sendo assim *Et* classificado como moderadamente sensível ao fungicida tiram.

O fludioxonil (Tabela 6) resulto no segundo melhor controle, com CI_{50} , média de todos os isolados, de 0,31 mg/L ($r^2=0,92$; $p<0,01$). Assim este ingrediente ativo também é classificado como altamente fungitoxico, mas quando comparado com iprodiona é 31 vezes menos potente ($0,31/0,01 = 31$).

O ingrediente ativo iprodiona (Tabela 7), apresentou-se como o mais potente para o controle de *Et*, com uma CI_{50} menor do que 0,01 mg/L, para todos os isolados ($r^2=0,93$; $p<0,01$). Assim *Et* foi classificado como altamente sensível ao fungicida iprodiona.

O ingrediente ativo metalaxil pertence ao grupo dos fungicidas fenilamidas, efetivos contra os Peronosporales (FULLER & GISI, 1985, KÖLLER, 1998, ROBERTS & HUTSON, 1999). O metalaxil é um dos ingredientes ativos de conhecida especificidade contra representantes do reino Estramenópila (os ex fungos da ordem Peronosporales: *Albugo*, *Bremia*, *Plasmopara*, *Pernonospora*, *Pseudoperonospora*, *Phytophthora* e *Pythium*) (REIS, 2010). Esta especificidade poderia explicar porque todos os isolados apresentaram CI_{50} superior a 50 mg/L, e em oito de eles (03-AR, 04-AR, 05-AR, 01-BR, 02-BR, 03-BR, 04-BR e 05-BR) não foi possível obter valores numéricos, já que o fungo não foi inibido na concentração máxima,

não sendo possível gerar a regressão e determinar a CI_{50} , por isso, figura como não significativo, e com CI_{50} superior a 50 mg/L.

O mesmo ocorreu com o carbendazim, onde somente para os isolados 04-BR e 05-BR, foi possível gerar a regressão. Segundo Reis et al. (2010), nem todos os fungos são sensíveis a todos os fungicidas (espectro de ação); alguns são sempre insensíveis a certas moléculas. Ex.: o fungo dos Gêneros *Alternaria*, *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* são insensíveis aos fungicidas benzimidazóis; por outro lado, os benzimidazóis não são fungitóxicos à estes gêneros. O fungicida carbendazim é da família dos benzimidazóis, o que explicaria porque esse ingrediente ativo não foi fungitóxico a *Et*. Esses resultados coincidem com o trabalho de Gonzalez & Gonzalez-Varela (2007) onde relatam que em estudos da concentração mínima inibitória *in vitro* o fungicida carbendazim não foi eficaz no controle do crescimento do micélio do fungo *Et*.

A interação entre os isolados e os fungicidas foi significativa ($p>0,05$) (Tabela 8). Entre os seis fungicidas comparados a iprodiona apresentou os menores valores de CI_{50} para os dez isolados, mostrando sua maior eficiência na inibição do crescimento miceliano de *Et*.

Tabela 2. Isolados, equação, coeficiente de determinação (r^2), concentração inibitória de 50% do crescimento miceliano (CI_{50}), classificação da sensibilidade, de *Exserohilum turcicum* para o fungicida **carbendazim**

Isolado	Equação*	r^2	CI_{50} **	p	Classificação***
01-AR			> 50	n.s.	I
02-AR			> 50	n.s.	I
03-AR			> 50	n.s.	I
04-AR	$y=1,08\ln(x) + 3,29$	0,79	> 50	< 0,01	I
05-AR			> 50	n.s.	I
01-BR			> 50	n.s.	I
02-BR			> 50	n.s.	I
03-BR			> 50	n.s.	I
04-BR			> 50	n.s.	I
05-BR	$y=0,58\ln(x) + 1,75$	0,79	> 50	< 0,01	I
Media	$y=0,38\ln(x) + 1,35$	0,87	> 50	0,02	I

n.s. (não significativo), *y = porcentagem de inibição do crescimento miceliano

**Concentração calculada pela equação (mg/L)

*** I (insensível), BS (baixa sensibilidade), MS (moderadamente sensível), AS (altamente sensível)

Tabela 3. Isolados, equação, coeficiente de determinação (r^2), concentração inibitória de 50% do crescimento miceliano (CI_{50}), classificação da sensibilidade, de *Exserohilum turcicum* para o fungicida **metalaxil**

Isolado	Equação*	r^2	CI_{50} **	p	Classificação***
01-AR	$y=0,74\ln(x) + 1,68$	0,25	> 50	< 0,01	I
02-AR	$y=10,09\ln(x) + 29,65$	0,81	> 50	< 0,01	I
03-AR			> 50	n.s.	I
04-AR			> 50	n.s.	I
05-AR			> 50	n.s.	I
01-BR			> 50	n.s.	I
02-BR			> 50	n.s.	I
03-BR			> 50	n.s.	I
04-BR			> 50	n.s.	I
05-BR			> 50	n.s.	I
Media	$y=1,46\ln(x) + 4,02$	0,71	> 50	< 0,01	I

n.s. (não significativo), *y = porcentagem de inibição do crescimento miceliano

**Concentração calculada pela equação (mg/L)

*** I (insensível), BS (baixa sensibilidade), MS (moderadamente sensível), AS (altamente sensível)

Tabela 4. Isolados, equação, coeficiente de determinação (r^2), concentração inibitória de 50% do crescimento miceliano (CI_{50}), classificação da sensibilidade, de *Exserohilum turcicum* para o fungicida **captana**

Isolado	Equação*	r^2	CI_{50} **	p	Classificação***
01-AR	-	-	>50	n.s.	I
02-AR	$y=11,55\ln(x)+32,30$	0,76	3,96	< 0,01	MS
03-AR	$y=7,69\ln(x)+21,32$	0,61	41,65	< 0,01	BS
04-AR	$y=5,46\ln(x)+13,36$	0,47	> 50	< 0,01	I
05-AR	$y=4,17\ln(x)+9,62$	0,30	> 50	< 0,01	I
01-BR	$y=4,87\ln(x)+11,71$	0,41	> 50	< 0,01	I
02-BR	$y=4,47\ln(x)+10,44$	0,32	> 50	< 0,01	I
03-BR	-	-	> 50	n.s.	I
04-BR	-	-	> 50	n.s.	I
05-BR	$y=8,96\ln(x)+29,60$	0,67	10,54	< 0,01	BS
Media	$y=6,59\ln(x)+18,08$	0,61	> 50	< 0,01	I

n.s. (não significativo), *y = porcentagem de inibição do crescimento miceliano

**Concentração calculada pela equação (mg/L)

*** I (insensível), BS (baixa sensibilidade), MS (moderadamente sensível), AS (altamente sensível)

Tabela 5. Isolados, equação, coeficiente de determinação (r^2), concentração inibitória de 50% do crescimento miceliano (CI_{50}), classificação da sensibilidade de, *Exserohilum turcicum* para o fungicida **tiram**

Isolado	Equação*	r^2	CI_{50} **	p	Classificação***
01-AR	$y=14,61\ln(x)+45,43$	0,82	1,36	<0,01	MS
02-AR	$y=14,84\ln(x)+43,90$	0,78	1,50	<0,01	MS
03-AR	$y=14,31\ln(x)+47,63$	0,87	1,18	<0,01	MS
04-AR	$y=14,03\ln(x)+47,42$	0,90	1,20	<0,01	MS
05-AR	$y=13,68\ln(x)+40,70$	0,8	1,97	<0,01	MS
01-BR	$y=14,17\ln(x)+48,61$	0,9	1,10	<0,01	MS
02-BR	$y=13,85\ln(x)+43,80$	0,86	1,56	<0,01	MS
03-BR	$y=14,03\ln(x)+47,42$	0,90	1,20	<0,01	MS
04-BR	$y=14,84\ln(x)+43,90$	0,78	1,50	<0,01	MS
05-BR	$y=14,40\ln(x)+45,70$	0,83	1,35	<0,01	MS
Media	$y=14,19\ln(x)+45,46$	0,86	1,37	<0,01	MS

n.s. (não significativo), *y = porcentagem de inibição do crescimento miceliano

**Concentração calculada pela equação (mg/L)

*** I (insensível), BS (baixa sensibilidade), MS (moderadamente sensível), AS (altamente sensível)

Tabela 6. Isolados, equação, coeficiente de determinação (r^2), concentração inibitória de 50% do crescimento miceliano (CI_{50}), classificação da sensibilidade, de *Exserohilum turcicum* para o fungicida **fludioxonil**

Isolado	Equação*	r^2	CI_{50} **	p	Classificação***
01-AR	$y=12,46\ln(x) + 60,80$	0,9	0,42	< 0,01	AS
02-AR	$y=7,42\ln(x) + 80,65$	0,77	0,02	< 0,01	AS
03-AR	$y=10,96\ln(x) + 66,17$	0,93	0,23	< 0,01	AS
04-AR	$y=13,05\ln(x) + 59,73$	0,90	0,47	< 0,01	AS
05-AR	$y=12,11\ln(x) + 63,50$	0,92	0,33	< 0,01	AS
01-BR	$y=11,73\ln(x) + 64,67$	0,92	0,29	< 0,01	AS
02-BR	$y=13,16\ln(x) + 58,06$	0,9	0,54	< 0,01	AS
03-BR	$y=10,56\ln(x) + 67,78$	0,93	0,19	< 0,01	AS
04-BR	$y=11,67\ln(x) + 65,19$	0,88	0,27	< 0,01	AS
05-BR	$y=11,03\ln(x) + 66,50$	0,93	0,22	< 0,01	AS
Media	$y=11,48\ln(x) + 63,30$	0,92	0,31	< 0,01	AS

n.s. (não significativo), *y = porcentagem de inibição do crescimento miceliano

**Concentração calculada pela equação (mg/L)

*** I (insensível), BS (baixa sensibilidade), MS (moderadamente sensível), AS (altamente sensível)

Tabela 7. Isolados, equação, coeficiente de determinação (r^2), concentração inibitória de 50% do crescimento miceliano (CI_{50}), classificação da sensibilidade, de *Exserohilum turcicum* para o fungicida **iprodisa**

Isolado	Equação*	r^2	CI_{50} **	p	Classificação***
01-AR	$y=3,28\ln(x) + 90,38$	0,82	< 0,01	< 0,01	AS
02-AR	$y=2,12\ln(x) + 93,02$	0,95	< 0,01	< 0,01	AS
03-AR	$y=2,24\ln(x) + 93,97$	0,84	< 0,01	< 0,01	AS
04-AR	$y=6,55\ln(x) + 81,00$	0,90	< 0,01	0,044	AS
05-AR	$y=5,40\ln(x) + 83,88$	0,89	< 0,01	0,018	AS
01-BR	$y=4,66\ln(x) + 86,42$	0,93	< 0,01	< 0,01	AS
02-BR	$y=4,05\ln(x) + 87,13$	0,93	< 0,01	< 0,01	AS
03-BR	$y=2,42\ln(x) + 91,97$	0,97	< 0,01	< 0,01	AS
04-BR	$y=5,72\ln(x) + 83,85$	0,90	< 0,01	0,050	AS
05-BR	$y=2,11\ln(x) + 92,66$	0,94	< 0,01	< 0,01	AS
Media	$y=3,82\ln(x) + 88,54$	0,93	< 0,01	< 0,01	AS

n.s. (não significativo), *y = porcentagem de inibição do crescimento miceliano

**Concentração calculada pela equação (mg/L)

*** I (insensível), BS (baixa sensibilidade), MS (moderadamente sensível), AS (altamente sensível)

Tabela 8. Concentração inibitória de 50% do crescimento miceliano (CI₅₀) de fungicidas para isolados de *Exserohilum turcicum*

Isolado	Fungicida (mg/L)					
	Carbendazim	Metalaxil	Captana	Tiram	Fludioxonil	Iprodiona
01-AR	B >50 a	B >50 a	B >50 a	A 1,36 a	A 0,42 a	A < 0,01 a
02-AR	B >50 a	B >50 a	A 3,96 b	A 1,50 a	A 0,02 a	A < 0,01 a
03-AR	B >50 a	B >50 a	B 41,65 a	A 1,18 a	A 0,23 a	A < 0,01 a
04-AR	B >50 a	B >50 a	B > 50 a	A 1,20 a	A 0,47 a	A < 0,01 a
05-AR	B >50 a	B >50 a	B > 50 a	A 1,97 a	A 0,33 a	A < 0,01 a
01-BR	B >50 a	B >50 a	B > 50 a	A 1,11 a	A 0,29 a	A < 0,01 a
02-BR	B >50 a	B >50 a	B > 50 a	A 1,56 a	A 0,54 a	A < 0,01 a
03-BR	B >50 a	B >50 a	B > 50 a	A 1,22 a	A 0,19 a	A < 0,01 a
04-BR	B >50 a	B >50 a	B > 50 a	A 1,50 a	A 0,27 a	A < 0,01 a
05-BR	C >50 a	C >50 a	B 10,54 b	AB 1,35 a	A 0,22 a	A < 0,01 a
Média	B >50	B >50	B > 50	A 1,37	A 0,31	A < 0,01
CV (%)	24,83					

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%
 Letras minúsculas comparam médias na coluna e as maiúsculas na linha.

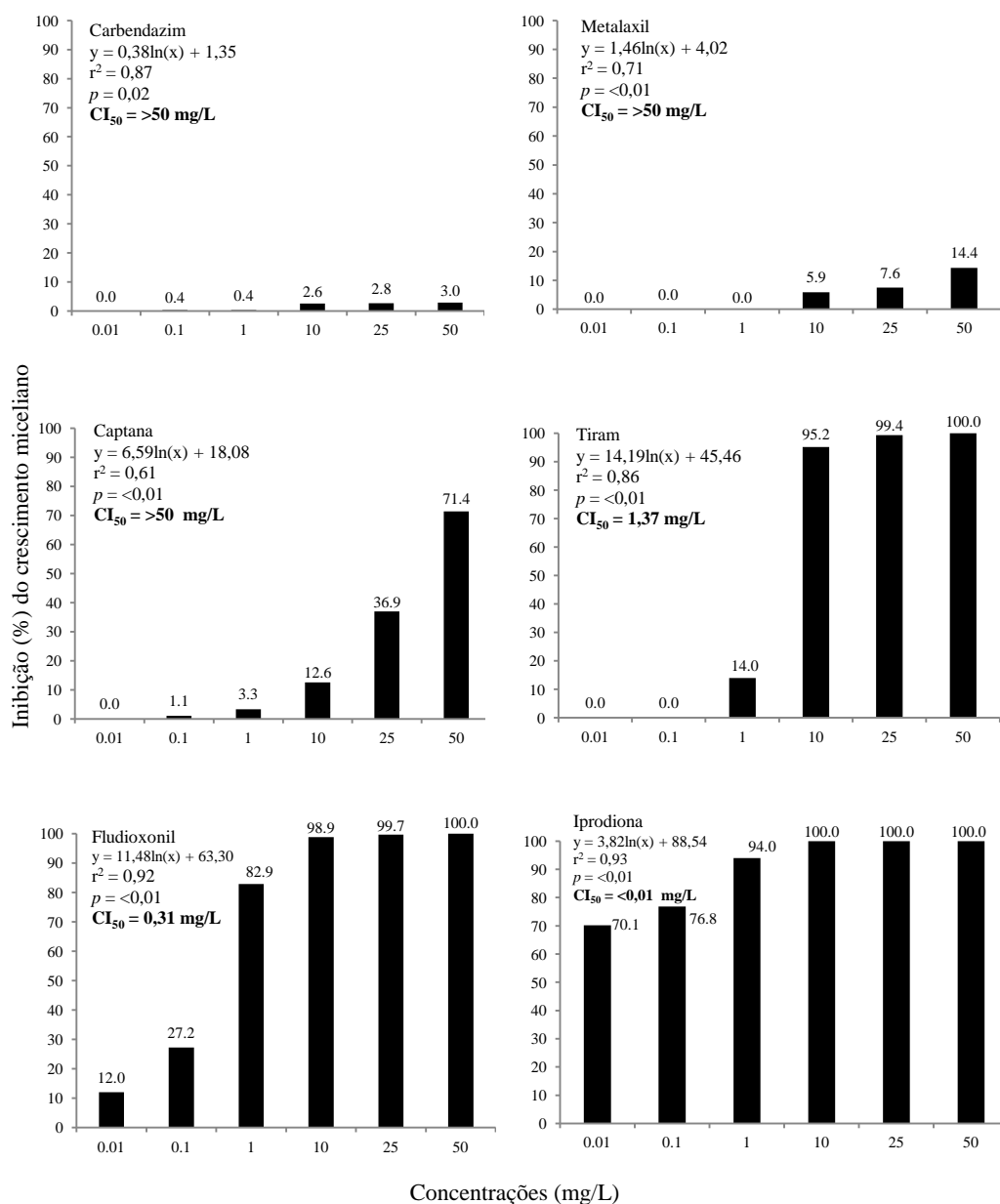
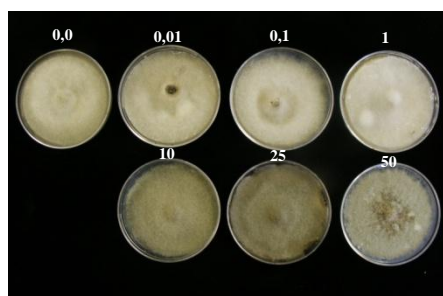
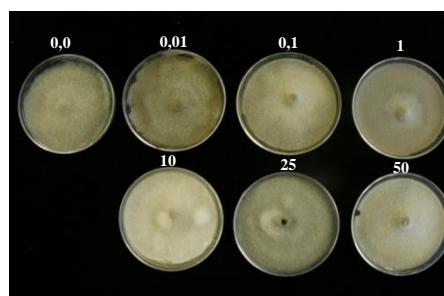


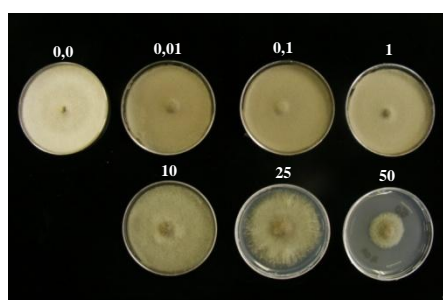
Figura 1. Inibição do crescimento miceliano de *Exserohilum turcicum*, *in vitro*, média de dez isolados, em seis concentrações.



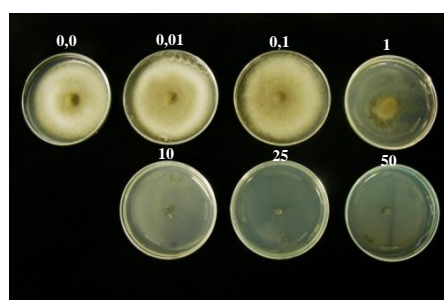
a) Carbendazim, isolado 01-AR



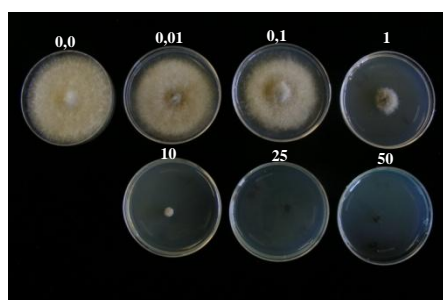
b) Metalaxil, isolado 03-BR



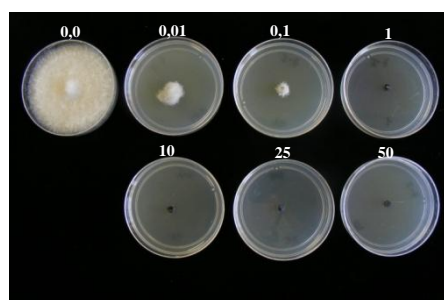
c) Captana, isolado 01-BR



d) Tiram, isolado 01-BR



e) Fludioxonil, isolado 05-AR



f) Iprodiona, isolado 04-AR

Figura 2. a), b), c), d), e), f) Crescimento miceliano de *Exserohilum turcicum* em meios de cultura suplementados com sete concentrações de fungicidas (a concentração 0,0 mg/L representou a testemunha).

4. CONCLUSÕES

Os ingredientes ativos captana, carbendazim e metalaxil foram atóxicos para *Et*.

O fungicida iprodiona mostrou-se o mais potente entre os fungicidas testados na inibição miceliana de *Et*, embora este ingrediente ativo não seja utilizado no tratamento de sementes de milho.

Os resultados obtidos neste trabalho, quanto a CI_{50} , podem ser utilizados como valores de referência para próximos estudos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G.N. Plant Pathology. 3rd. Ed. Academic Press, New York. 703p. 1996.

AGROFIT. Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins/DFIA/DAS. 2012.

AKAI, S.; OUCHI, S., eds. Phytopathological Society of Japan, Tokyo, 1971, p.129-152.

ALBUQUERQUE, M. C. F. Desempenho germinativo e testes de vigor para sementes de girassol, milho e soja, semeadas sob condições de estresse ambiental. 2000. 161 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Produção e Tecnologia de Sementes) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

ALCORN, J.L. The taxonomic of "*Helminthosporium*" species. Annual Review of Phytopathology 26:37-56. 1988.

ALCORN, L.L. Generics concepts in *Dreschelera*, *Bipolaris* and *Exserohilum*. Mycotaxon 17:1-86. 1983.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W. & BLACKWELL, M. Introductory mycology. New York. John Willey & Sons. 4th. Edition. 1996. 869 p.

ALMEIDA, A.M.P. & HEIDRICH-SOBRINHO, E. Raças fisiológicas de *Helminthosporium turcicum* Pass., no Rio Grande do Sul. Agronomia Sulriograndense, Rio Grande do Sul, 14:285-290, 1978.

BABU, R.; MANI, V.P.; PANDEY, A.K.; PANT, S.K.; KUNDU, S. & GUPTA, H.S. Maize Research at Vivekanand Parvatiya Krishi Anusandhan Sansthan - An Overview. Technical Bulletin, Vivekanand Parvatiya Krishi Anusandhan Sansthan, Almora, 21: 31, 2004.

BACH, E. & KIMATI, H. Comparação morfológica e patogênica de *Exserohilum turcicum*, isolado de milho, sorgo e capim massambará. Summa Phytopathologica, v.21, p.134-139. 1995.

BACH, E.E. & KIMATI, H. Morfologia e patogenicidade de *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs, isolado de milho, sorgo e capim massambará. Fitopatologia Brasileira 17:201. 1992.

BACH, E.E. & KIMATI, H. Serologia e eletroforese de *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs, isolado de milho, sorgo e capim massambará. Fitopatologia Brasileira 17:166-167. 1992.

BACH, E.E.; LIMIRO, C. & RODRIGUEZ, E. Extração e ação de toxinas de *Exserohilum turcicum* em plantas de milho. ConScientiae Saúde, São Paulo, v.4, p.108-113, 2005.

BALMER, E. Doença de milho. In: GALLI, F. ed. Manual de Fitopatologia. Piracicaba: Ceres, v.20, p.371-391, 1980.

BALMER, E. & PEREIRA, O.A.P. Doenças do milho. In: Paterniani, E. & Viegas, G.P. (ed). Melhoramento e produção de milho. 2ª ed. Campinas, Fundação Cargill, 1987. pp.597-634.

BARBA, J.T. *Bipolaris sorokiniana* (*Cochliobolus sativus*) em sementes de cevada: detecção, transmissão e controle. 2000. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia). Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2001.

BEADLE, G. (1939) Teosinte and the origin of maize. J. Heredity, 30, 245-247.

BEGUM, H.; RAJ, R.B. & SATYANARAYANA, E., Field evaluation of five fungicides to control turcicum leaf blight in maize. Indian Journal of Plant Protection, 21: 110-111. 1993.

BENTOLILA, S.; GUITTON, C.; BOUVET, N.; SAILAND, A.; NYKAZA, S. & FREYSSINET, G. (1991) Identification of RFLP marker tightly linked to the Ht1 gene in maize. Theor Appl Genet 82:393-398.

BERGER, R.D. Forecasting *Helminthosporium turcicum* attacks in Florida sweet corn. Phytopathology, St. Paul, v.60, p.1284, 1970.

BERGER, R.D. *Helminthosporium turcicum* lesion numbers related to number of trapped spores and fungicide sprays. *Phytopathology* 63:930-933. 1973.

BHOWMIK, L. & PRASADA, R. Physiologic specialization in *Helminthosporium turcicum* Pass. From India. *Phytopathologische Zeitschrift*, Berlin, v.68, p.84-87, 1970.

BIGIRWA, G.; JULIAN, A.M. & ADIPALA, E. Characterization of Uganda isolates of *Exserohilum turcicum* from maize. *African Crop Science Journal*, Vol. 1, N°1, p.69-72, 1993.

BLEICHER, J. & BALMER, E. Armadilha para captura de conídios de *Exserohilum turcicum*, modelo Grimpa e relações entre parâmetros climáticos e captura de conídios. *Summa Phytopathologica* 19:118-123. 1993.

BOOSALIS, M.G.; SUMMER, D.R. & RAO, A.S. Overwintering of conidia de *Helminthosporium turcicum* on corn residues and in the soil in Nebraska. *Phytopathology* 57:990-996. 1967.

BORCHARDT, D., WELZ, G. & GEIGER, H. Genetic structure of *Setosphaeria turcica* populations in tropical and temperate climates. *Phytopathol.* 88,322-329. 1998

BOWEN, K.L. & PEDERSEN, W.L. Effects of northern leaf blight and detasseling on yields and yield components of corn inbreds. *Plant Disease*, St. Paul, v.72, p.952-956, 1988.

BRASIL (2009). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de Análise Sanitária de Sementes / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: MAPA/ACS, 2009. 200 p.

BUSH, M.; PIPERNO, D. & COLINVAUX, P. (1989) A 6,000 year history of Amazonian maize cultivation. *Nature*, 340, 303-305.

CAMPI, M.D. *Helminthosporium turcicum* Pass. en la Republica Argentina. Lilloa, tomo IV, p.5-32, 1939. In: MARCHIONATTO, J.B. Manual de las enfermedades de las plantas. Ed. Sudamericana, Buenos Aires, Argentina, 1944.

CÂNDIDA, R.J. de FARIAS; DEL PONTE, E. M.; CORRÊA, C. L.; AFONSO, A. P. & PIEROBOM, C. R. Infecção de sementes de trigo com *Bipolaris sorokiniana* pela técnica de restrição hídrica. Tropical plant pathology.

CARSON, M.L. Inheritance of latent period length in maize infected with *Exserohilum turcicum*. Plant Dis. 79, 581-585. 1995

CARSON, M.L. & VAN DYRE, C.G. Effect of light and temperature on expression of partial resistance of maize to *Exserohilum turcicum*. Plant Disease, v.78, n.5, p.519-522, 1994.

CARVALHO, J.C.B. Uso da restrição hídrica na inoculação de *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Lavras: UFLA. 98p. (Dissertação Mestrado). 1999.

CASA, R.T.; REIS, E.M. & ZAMBOLIM, L. Fungos associados a semente de milho produzida nas Regiões Sul e Sudeste do Brasil. Fitopatologia Brasileira 23:370-373. 1998a.

CASA, R.T.; REIS, E.M.; MEDEIROS, C.A. & MOURA, F.B. Efeito do tratamento de sementes de milho com fungicidas, na proteção de fungos do solo, no Rio Grande do Sul. Fitopatologia Brasileira 20:633-638. 1995.

CASA, R.T.; REIS, E.M.; SEVERO, R.; TRENTON, S & BLUM, M.M.C. Prevenção e controle de doenças na cultura de milho. In: Sandini, I.A. & Fancelli, A. L. Milho: estratégias de manejo para a região sul. Guarapuava: Fundação Agrária de Pesquisa Agropecuária, 2000. 209p.

CASA, R.T. & REIS, E.M. Efeito do tratamento de sementes de milho com fungicidas na proteção de *Pythium* no solo. Fitopatologia Brasileira 19:318. 1994.

CASA, R.T.; REIS, E.M., SEVERO, R.; DENTI, E.; TRENTON, S. & BLUM, M.M.C. Prevenção e controle de doenças na cultura do milho. In: Sandini, I.A. & Fancelli, A.L. Milho: estratégias de manejo para a região sul. Guarapuava: Fundação Agrária de Pesquisa Agropecuária, 2000. 209 p.:il.

CHANG, H.S. & FAN, K.C. Comparative studies on some biology and pathology of corn and broom corn isolates of *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard Suggs. Botanical Bulletin Academia Sinica, China, v.27, p.209-218, 1986.

CHENULU, V.V. & HORA, T.S. Studies on losses due to *Helminthosporium* blight of maize. Indian Phytopathology, 15: 235-237, 1962.

CHIDAMBARAM, P.; MATHUR, S.B., & NEERGAARD, P. Identification of seed-borne *Drechslera* species. Friesia.10: 165-207. 1973

CHILTON, S.J.P. The occurrence of *Helminthosporium turcicum* in the seed and glumes of Sudan Grass. Phytopathology, v. 30, nº.6, p.533-536, 1940.

COTA, L.V.; da COSTA, R.V.; da SILVA, D.D. & PARREIRA, D.F. Recomendacoes para o controle químico da Helmintosporiose do sorgo (*Exserohilum turcicum*). Circular técnica 149, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, ISSN 1679-1150, 2010.

COX, R. Control of *Helminthosporium turcicum* blight disease of sweet corn in South Florida. Phytopathology, 46: 112-115. 1956.

CUQ, F.; HERRMANN-GORLINE, S.; KLAEBE, A.; ROSSIGNOL, M. & PETTPREZ, M. Monocerin in *Exserohilum turcicum* isolates from maize and the study of its phytotoxicity. Phytochem. 34, 1265-1270, 1993.

DE LEON, C. Maize diseases: a guide for field identification. Maize Program. Centro International de Mejoramiento de Maiz y Trigo. CIMMYT. 3rd edition. 114p. 1984.

DE ROSSI, R.L.; REIS, E.M.; VIANA, E. & BRUSTOLIN, R. Meio semi-seletivo para detecção e quantificação de *Exserohilum turcicum* em amostras de sementes de milho. Anais do 45º Congresso Brasileiro de Fitopatología 2012, Manaus, Amazonas. 2012.

DE ROSSI, R.L.; PLAZAS, M.C.; BRUCHER, E.; DUCASSE, D. & GUERRA, G.D. Susceptibilidad a Roya común del Maíz (*Puccinia*

sorgho), utilización de fungicidas y momentos de aplicación para su control, en tres híbridos de maíz, en el centro norte de la provincia de Córdoba. XIII Jornadas Fitosanitarias Argentinas, Santiago del Estero. 2009.

DEGEFU, Y.; LOHTANDER, K. & PAULIN, L. Expression patterns and phylogenetic analysis of two xylanase genes (htxyl1 and htlyl2) from *Helminthosporium turcicum*, the cause of northern corn leaf blight of maize. *Biochimie*, 86, 83-90, 2004.

DEGEFU, Y.; PAULIN, L. & LUBECK, P. Cloning, sequencing and expression of a xylanase gene from the maize pathogen *Helminthosporium turcicum*. *Eur. J. Plant Pathol.* 107, 457- 465, 1997.

DI RIENZO, J.A.; BALZARINI, M.; CASANOVES, F.; GONZALEZ, L.; TABLADA, M. & ROBLEDO, C.W. InfoStat, software estadístico. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. 2010.

DHARANENDRASWAMY, S. Studies on turcicum leaf blight of maize caused by *Exserohilum turcicum*. M.Sc. (Agri.) Thesis, University of Agricultural Sciences, Dharwad. 2003.

DOEBLEY, J. (2004) The genetics of maize evolution. *Annu. Rev. Gen.* 38, 37-59.

DOWSWELL, C.D.; PALIWAL, R.L. & CANTRELL, R.P. Maize in the third world. Boulder, CO, USA, Westview Press. 1996.

DRECHSLER, C. Some graminicolous species of *Helminthosporium*: I. *J. Agric. Res.* 24:641-739, 1923.

EDGINGTON, L. V. & KLEW, K. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. *Phytopathology*, n. 61, p. 42-44, 1971.

ELLIOT, C.H. & JENKINS, M.T. *Helminthosporium turcicum* leaf blight of corn. *Phytopathology* 36:660. 1946.

ELLIS, M.B. Dematiaceous hyphomycetes. Kew: CAB. 608p. 1971.

ESTEVEZ, M.C.F. Reações a *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs em milho (*Zea mays* L.) e variabilidade do patógeno. Master's Thesis, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz", Piracicaba. 1989.

FALLAH MOGHADDAM, P. & PATAKY, J.K. Reactions of isolates from matings of races 1 and 23 N of *Exserohilum turcicum*. Plant Disease, St. Paul, MN, 78:767-771, 1994.

FANCELLI, A.L. Influência do desfolhamento no desempenho de plantas e de sementes de milho (*Zea mays* L.). Piracicaba. ESALQ/USP. 172p. 1988 (Tese de Doutorado).

FAO. Food and agriculture organisation of the united nations. www.faostat.fao.org, 2012

FAO/GIEWS. Food and agriculture organisation of the United Nations (FAO). Global information and early warning system on food and agriculture. (GIEWS). 2012

FERNANDES, M.C.A & BALMER, E. Seleção recorrente fenotípica e níveis de resistência a *Exserohilum turcicum* em progênies de milho. Fitopatologia brasileira 16:190-196, 1991.

FERNANDES, M.C.A & BALMER, E. Variabilidade de isolados de *Exserohilum turcicum* em cultivares de milho (*Zea Mays*). Revista Universidade federal rural do Rio de Janeiro. Rural, Serie, Ciências da Vida. Vol 22, n.1, p. 01-05, 2002.

FERNANDEZ VALIELA, M.V. Introducción a la fitopatología. Buenos Aires, Gadala, 1969.

FERNANDEZ, F.T. & OLIVEIRA, E. Principais doenças na cultura do milho. Sete lagoas: Embrapa-CNPMS, 1997. 80p. (Embrapa-CNPMS. Circular Técnica, 26.)

FERNANDEZ, M.R. Manual para laboratório de fitopatologia. Passo Fundo, EMBRAPA-CNPT, 1993. 128p. (EMBRAPA-CNPT. Documentos 6)

FISHER, K.S. & PALMER, F.E. Tropical maize. In: Goldsworthy, P.R. & Fisher, N.M. (Ed). The physiology of tropical field crops. Wiley. p. 231-248. 1984.

FORCELINI, C.A.; REIS, E.M. Doenças da aveia. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BRGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. Manual de fitopatologia, Vol. 2: Doenças de plantas cultivadas. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. p. 105-111.

FREDERIKSEN, R.A. & ODVODY, G.N. Compendium of sorghum diseases. American Phytopathology Society, 78p., 2000.

FREDERIKSEN, R.A. Compendium of Sorghum Diseases. American Phytopathology Society, St. Paul. 1991. 82 pp.

FROSI, J.F. & BALMER, E. Reações de linhagens de milho a *Helminthosporium turcicum* Pass., em casa-de-vegetação. Fitopatologia Brasileira 5:229-238. 1980a.

FROSI, J.F. & BALMER, E. Reações de linhagens de milho a *Helminthosporium turcicum* Pass., em condições de campo. Fitopatologia Brasileira 5:239-244. 1980b.

FULLER, M.S. & GISI, U. Miscellaneous fungicides. Comparative studies on the in vitro activity of the fungicides oxadixyl and metalaxyl. Mycologia 77:424-32. 1985. In:

GALINAT, W.C. The origin of corn. In G.F. Sprague & J.W. Dudley, eds. Corn and corn improvement, 3rd ed., p. 1-31. Madison, WI, USA, American Society of Agronomy. 1988.

GIANASI, L.; de CASTRO, H.A. & da SILVA, H.P. Raças fisiológicas de *Exserohilum turcicum* identificadas em regiões produtoras de milho no Brasil, safra 93/94. Summa Phytopathologica, v.22, p. 214-217, 1996.

GONZALEZ, A.J. & GONZALEZ-VARELA, G. Ensayo in vitro de fungicidas frente a *Exserohilum turcicum*, agente causal del tizón norteño del maíz, en Asturias. Bol. San. Veg. Plagas, 33:289-295, 2007.

GUERRA, G.D. & DE ROSSI, R.L. Panorama Sanitario del cultivo de Maíz en la Región Centro Norte de Córdoba, Jornada de Actualización Técnica de Cultivos de Verano - CREA - Campaña 2009/2010. Pg.34-36. 2010.

HARTMAN, G. L.; SINCLAIR, J. B. & RUPE, J. C. Compendium of Soybean Diseases, 4th edn, ed. G. L. vi+100 pp. St. Paul, Minnesota: APS Press. 1999.

HARLAPUR, S.I., WALI, M.C., ANAHOSUR, K.H. AND MURALIKRISHNA, S. A report on survey and surveillance of maize diseases in northern Karnataka. Karnataka Journal of Agricultural Sciences, 13: 750-751, 2000.

HEIDRICH SOBRINHO, E. & HERMES, M.T.L. Studies of genetic resistance to and virulence of *Trichometasphaeria turcica* Lutt in corn. Revista Brasileira de Genética, 4:17-28, 1981.

HILU, H. M. & HOOKER, A. L. Host-pathogen relationship of *Helminthosporium turcicum* in resistant e susceptible corn seedlings. Phytopathology, v. 54, n. 5, p. 570-575, 1964.

HILU, H. M. & HOOKER, A. L. Localized infection by *Helminthosporium turcicum* on corn leaves. Phytopathology, 55:189-192, 1965.

HILU, H. M. & HOOKER, A. L. Monogenic chlorotic lesion resistance to *Helminthosporium turcicum* in corn seedlings. Phytopathology, St. Paul, v.53,p.909-912, 1963.

HOOKER, A.L. & PERKINS, J.M. Helminthosporium leaf blights of corn – the state of the art. Proceedings of the third-fifth annual corn and sorghum research conference, Chicago, p.68-87, 1980.

HOOKER, A.L. & TSUNG, Y.K. Relationship of dominant genes in corn for chlorotic-lesion resistance to *Helminthosporium turcicum*. Plant. Dis. 64:387-388, 1980.

HOOKER, A.L. A new tipe of resistant in corn to *Helminstosporium turcicum* leaf blight of corn. Plant diseases Rep. 45:670-671, 1961.

HOOKER, A.L. A second major gene locus in corn for chlorotic-lesion resistance to *Helminthosporium turcicum*. Crop Science 17:132-135, 1977.

HOOKER, A.L. Inheritance of chlorotic-lesion resistance to *H. turcicum* in seedling corn. Phytopathology 53:660-662, 1963.

HUGHES, G.R. & HOOKER, A.L. Gene action conditioning resistance to northern leaf blight in maize. Crop Science 11:180-184, 1971.

IDIA. Inf. Invest. Agric. INTA, Buenos Aires. 222:26, 1966. In: FERNANDEZ VALIELA, M.V. Introducción a la fitopatología. Buenos Aires, Gadala, 1969

ILTIS, H.H. From teosinte to maize: the catastrophic sexual transmutation. Science, 222: 886-894. 1983.

ILTIS, H.H. & DOEBLEY, J. Taxonomy of *Zea* (Gramineae). II. Subspecific categories in the *Zea mays* complex and a generic synopsis. Am. J. Bot., 67: 994-1004. 1980.

INDICAÇÕES. Reunião Técnica anual de milho e sorgo. Indicações técnicas para o cultivo de milho e de sorgo no Rio Grande do Sul. Safras 2009/2010 e 2010/2011. Veranópolis, RS. 2009.179 p.

ISSA, E. Controle químico de *Helminthosporium turcicum* Pass. em milho pipoca, *Zea mays* L. Biológico, Campinas, v.49, n.2,p.41-43, 1983.

JENKINS, M.T. & ROBERT, A.L. Inheritance of resistance to the leaf of corn caused by *Helminthosporium turcicum*. Agron Journal 44:136-140. 1952

JORDAN, E.G.; PERKINS, J.M.; SCHALL, R.A. & PEDERSEN, W.L. Occurrence of race 2 of *Exserohilum turcicum* on corn in the central and eastern United States. Plant Diseases 67:1163-1165, 1983.

KAMIKOGA, A.T.M.; SALGADO, C.L. & BALMER, E. Reactions of different populations of popcorn (*Zea mays*) to *Helminthosporium turcicum*. Summa Phytopathologica 17: 100-104. 1991.

KHATRI, N.K. Influence of temperature and relative humidity on the development of *Helminthosporium turcicum* on maize in western Georgia. Indian Journal of Mycology and Plant Pathology, 23: 35-37. 1993.

KEISSAR, H.; BASHAN, B.; LEVY, Y. & KENIGSBUCH, D. Stage specificity of catalase isoform activity in *Exserohilum turcicum*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 60,163-168, 2002.

KNOX-DAVIES, P. Penetration of maize leaves by *Helminthosporium turcicum*. Phytopathol. 64, 1468-1470, 1974.

KNOX-DAVIES, P.S. & DICKSON, J.G. (1960) Cytology of *Helminthosporium turcicum* and its ascigerous stage, *Trichometasphaeria turcica*. American Journal of Botany 47: 328-339

KÖLLER, W. Chemical approaches to managing plant pathogens. In: Rubersorn, J.R. (Ed.). Handbook of Integrated Pest Management. Dekker, New York, p. 1-38.1998.

KODSUEB, R.; DHANASEKARAN, V., APTROOT, A.; LUMYONG, S.; MCKENZIE, E.; HYDE, K. & JEEWON, R. The family Pleosporaceae: intergeneric relationships and phylogenetic perspectives based on sequence analyses of partial 28S rDNA. Mycologia, 98, 571-583. 2006.

LANGARO, N.C. Detecção, Transmissão e controle de *Drechslera avenae* em sementes de aveia branca.1998. Dissertação, (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 1998.

LAXMINARAYANA, C. & SHANKARLINGAM, S. Turcicum leaf blight of maize, techniques of scoring for resistance to important diseases of maize. Proceedings of All India Coordinated Maize Improvement Project, Indian Agricultural Research Institute, New Delhi, pp. 16-24. 1983.

LEACH, C.M.; FULLERTON, R.A. & YOUNG, K. Northern leaf blight of maize in New Zealand: Relationships of *Drechslera turcica* airspora to factors influencing sporulation, conidium development, and chlamydospore formation. Phytopathology 67:629-636. 1977.

LEATH, S. & PEDERSEN, W.L. An inoculation technique to detect the HtN gene in inbred lines of corn under greenhouse conditions. Plant Disease, St. Paul, v.35, p. 520-522, 1983.

LEONARD, K.J. & SUGGS, E.G. *Setosphaeria prolata* is the ascigenous state of *Exserohilum prolata*. Mycologia, 66: 181-297. 1974.

LEONARD K.J.; LEVY, Y. & SMITH, D.R. Proposed nomenclature for pathogenic races of *Exserohilum turcicum* on corn. Plant Dis 73:776-777, 1989.

LEONARD, K.J.; THAKUR, R.P.; LEATH, S. Incidence of *Bipolaris* and *Exserohilum* species in corn leaves in north Carolina. Plant Disease, St. Paul, v.72, p.1034-1038, 1988.

LEVY Y. & COHEN Y. Biotic and environmental factors affecting infection of sweet corn with *Exserohilum turcicum*. Phytopathology.1983. 73:722-725.

LEVY, Y. Analisis of epidemics of northern leaf blight on sweet corn in Israel. Phytopathology, St. Paul, v.79, p.1253-1255, 1989.

LEVY, Y. & COHEN, Y. Differential effect of light on spore germination of *Exserohilum turcicum* on corn leaves and corn leaf impressions. Phytopathol. 73, 249-252. 1983.

LEVY, Y. Variation in fitness among field isolates of *Exserohilum turcicum* in Israel. Phytopathology, St. Paul, v.75, p.163-166, 1991.

LIM, S.M.; KINSEY, J.G. & HOOKER, A.L. Inheritance of virulence in *Helminthosporium turcicum* to monogenetic resistance in corn. Phytopathol. 64, 1150-1151, 1974.

LIPPS, P.E & MILLS, D. Northern corn leaf blight. Extension fact sheet. OH-43210-1087. Ohio State University. 2002.

LUCCA FILHO, O.A. Metodologia dos testes de sanidade de sementes. In: SOAVE, J. & WETZEL, M.M.V. da S. Patologia de sementes. Campinas: Fundação Cargill/Abrates. 1987.p. 276-298.

LUTTREL, E.S. The perfect state of *Helminthosporium turcicum*, Phytopathology 48:281-287. 1958.

MACHADO A.Q.; MACHADO J.C.; CARVALHO M.G.G.C.; CASSETARI NETO D. & SOUSA M.V. Potencial do uso da restrição hídrica em testes de sanidade de sementes de algodoeiro. Fitopatologia Brasileira 32:408-414. 2007.

MACHADO, J. da C. Patologia de sementes: fundamentos e aplicações. Lavras: ESAL/FAEPE, 1988.

MACHADO, J. da C. Tratamento de sementes no controle de doenças. Lavras: UFLA/FAEPE, 2000.

MACHADO, J. C.; OLIVEIRA, J.A.; VIEIRA, M.G.G. & ALVES, M.C. Inoculação artificial de sementes de soja por fungos, utilizando solução de manitol. Revista Brasileira de Sementes, vol. 23, nº 2, p.95-101, 2001.

MACHADO, J. C.; OLIVEIRA, J.A.; VIEIRA, M.G.G. & ALVES, M.C. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). Rev. bras. sementes [online]. 2004, vol.26, n.1, pp. 62-67.

MACHADO, J.C.; LANGERAK, C.J. & JACCOUD-FILHO, D.S. Seed-borne fungi: A Contribution to Routine Seed Health Analysis. ISTA. 2002.134 pp.

MACHADO, J.C.; OLIVEIRA, J.A. & VIEIRA, M.G.G.C. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de milho. Revista Brasileira de Sementes, Brasília, v. 23, n. 2, p. 88-94, 2001.

MAGyP. Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca. Dirección de Información Agrícola y Forestal. Buenos Aires, Argentina, 2011.

MALAGUTI, G. & SUBERO L.M. El tizón de las hojas del maíz causado por *Helminthosporium maydis* en Venezuela. Agronomía tropical. 21(4):299-312.

MALCA, I. & ULLSTRUP, A.J. Effects of carbon and nitrogen nutrition on growth and sporulation of two species fo

Helminthosporium. Bulletin of the Torrey Botanical Club 89:240-249, 1962

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - Assessoria de Gestão Estratégica. Brasília, Brasil, 2011.

MARTIN, T. *Setosphaeria turcica*, fungal mating and plant defense. Doctoral Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 2011.

MASIAS, O.R. & BERGQUIST, R.R. Host-specific forms of *Trichometasphaeria túrcica* in relation to homokaryons and heterokaryons in nature. Phytopathology 64:436-438, 1974.

MAUDE, R.B. Achievements and objectives in research on seed-borne diseases of vegetables. In: NASSER, L.C., WETZEL, M.M. & FERNANDES, J.M. (Eds.) Proceedings; Seed Pathology International Advanced\course. Brasília, ABRATES, 1988. Part 4, p. 267-275.

MAHAMOOD, A.; JAVED, N.; AHMAD, R. & RAHEEL, Z.I. Biological control of maize leaf blight caused by *Helminthosporium turcicum* Pass in vitro. Pakistan Journal of Phytopathology, 7: 62-64. 1995.

McGEE, D. C. Maize Diseases: A Reference Source for Seed Technologists. American Phytopathological Society, St. Paul, MN. 1988.

McNEW, G. L. The nature, origin and evolution of parasitism. In: HORSFALL, J.G., DIMOND, A. E. Eds. Plant Pathology, New York, Academic Press, v.2, p.2-66, 1960.

MENTEN, J.O.M. Prejuízos causados por patógenos associados às sementes. In: MENTEN, J.O.M. Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico. São Paulo: Ciba Agro. 1995. p. 115 - 136.

MEREDITH, D.S. Airborne conidia of *Helminthosporium turcicum* in Nebraska. Phytopathology 56:949-952. 1966.

MOGHADDAM, P. & PATAKY, J. Reactions of isolates from matings of races 1 and 23N of *Exserohilum turcicum*. Plant Dis. 78, 767-771. 1994

MORAES, M.H.D. Testes de sanidade de sementes em rotina no Brasil: situação atual, contribuições e perspectivas. In: MENTEN, J.O.M. Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico . São Paulo: Ciba Agro, 1995. p. 37 - 51.

MUCHOVEJ, J.J.; MUCHOVEJ, R.M.C. & RIBEIRO-NESIO, M.L. Taxonomia de *Drecheslera*, *Bipolaris* e *Exserohilum*. Fitopatologia Brasileira 13:211-224. 1988.

MUIRU, W. Histological studies and characterization of races of *Exserohilum turcicum* the causal maize agent of northern leaf blight of maize in Kenya. PhD thesis. University of Nairobi, Kenya, 2008.

MUNFORD, J.D. & NORTON, G.A. Economics of decision making in pest management. Annual. Review Entomology. 29:157-174.1984.

NAKAMURA, A.M. & GIMENES-FERNANDES, N. Caracterização patogênica de espécies de *Bipolaris* e de *Exserohilum* isoladas de milho e de sorgo. Summa Phytopathologica 19:38. 1993.

NAKAMURA, A.M. & GIMENES-FERNANDES, N. Obtenção de esporos de *Bipolaris* e de *Exserohilum* em meio de cultura. Summa Phytopathologica 19:38. 1993.

NERBASS, F.R.; CASA, R.T. & ANGELO, H.R. Sanidade de sementes de milho comercializadas na safra agrícola de 2006/07 em Santa Catarina e no Rio Grande do Sul. Ciências Agroveterinárias. Lages, v.7, n.1, p. 30-36, 2008.

OBI, I.U.; HOOKER, A.L. & LIM, S.M. Phytoalexin production in corn resistant to three species os *Helminthosporium* fungi. Phytopathology, 70:228-236, 1980.

OGASARAWA, N.; HONMA, N.; ISHIWARA, K.; TANAKA, H. & TAMARI, K. Biochemical changes during formation of conidia. Morphological and biochemical events in plant-parasite interaction. In:

AKAI, S.; OUCHI, S., eds. Phytopathological Society of Japan, Tokyo, 1971, p.129-152.

OGLIARI, J.L. & GUIMARAES, M.A. New genes in the *Zea mays* - *Exserohilum turcicum* pathosystem. Genetics and Molecular Biology, 28, 3, 435-439. 2005.

PALIWAL, R.L.; GRANADOS, G.; LAFITTE, H.R.; VIOLIC, A.D. & MARATHEÉ, J.P. El maíz en los trópicos: mejoramiento y producción. Dirección de Información, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Viale delle Terme di Caracalla, 00100 Roma, Italia. 2001.

PAMMEL, N.B.; KING, D.N. & BAKKE, A.K. Two barley blights. Bulletin Stav. Pat.Veg. Deva, 21: 1-62. 1910.

PASSERINI. Lanebbia Delgranotur Co. Bol. Comiz, Agriculture. Parmense, 10: 3. (o texto original não foi observado). 1876.

PATAKY, J.K. Relationships between yield of sweet corn and northern leaf blight caused by *Exserohilum turcicum*. Phytopathology. 82:370-375. 1992.

PATIL, S.J.; WALI, M.C.; HARLAPUR, S.I. & PRASHANTH, M. Maize Research in north Karnataka. Bulletin, University of Agricultural Sciences, Dharwad, p. 54.2000.

PATTERSON, E.B.; HOOKER, A.L. & HAGAN, W.L. Location of a dominant gene in maize for resistance to *Helminthosporium turcicum*. Maize Gent. Coop. News Letter, 37:45, 1963.

PAUL, Y.S.; HUNDE, B.; ALEMU, M. & AYALEW, M. Studies on seed-borne mycoclora of wheat in Ethiopia. In: TANNER, D.G. Developing sustainable wheat production systems. The eight regional wheat workshop for eastern, central and south Africa. Addis Ababa, Ethiopia: CIMMYT. 1994.

PEDROSO, D. C.; MENEZES, V. O.; MARLOVE, F. B. M.; PIVETA, G.; TUNES, L.M.; MULLER, J. & MENEZES, N.L. Métodos de inoculação de *Alternaria alternata* e *A. dauci* em sementes

de salsa e sua influência na qualidade fisiológica. Rev. bras. sementes vol.32 nº3. Londrina Sept. 2010.

PEDERSEN, W.L. Field evaluation of maize inbreds and population selections to *E. turcicum*. Phytopathology, 74: 818. 1984.

PELMUS, V.; CRAIN, D. & CRACIUD. Effect of some ecological factors on *Helminthosporium turcicum* on successive maize crop problem. Protectia-Pkntel, 14: 119-132. 1986.

PEREIRA, C. E.; OLIVEIRA, J. A.; MARQUES ROS, M. C.; OLIVEIRA, G. E. & NETO, J. C. Tratamento fungicida de sementes de soja inoculadas com *Colletotrichum truncatum*. Cienc. Rural vol.39 n.9 Santa Maria Dec. 2009 E.pub. Oct. 30, 2009.

PEREIRA, O.A.O Análise da situação atual de doenças de milho no Brasil e disponibilidade de germoplasma resistente. Summa Phytopathologica, v.21, nº1, 1995.

PEREIRA, O.A.P. Doenças do milho (*Zea mays* L.). In Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L.E.A. & Rezende, J.A.M. (Eds.) Manual de Fitopatologia. Volume 2: Doenças de plantas cultivadas. 3ed. São Paulo: Agronomica Ceres, 1997. p. 538-555.

PEREIRA, O.A.P.; SILVA, H.P. & REZENDE, I.C. Perda de produção de milho causada por *Exserohilum turcicum* Pass. Leonard & Suggs. Fitopatologia Brasileira 18:333.1993.

PERKINS, J.M. & PEDERSEN, W.L. Disease development and yield losses associated with northern leaf blight on corn. Plant Disease, St. Paul, MN, 71:940-943.1987.

PINGALI, P.L. & HEISEY, P.W. Cereal crop productivity in developing countries: past trends and future prospects. In Proc. Conf. Global Agric. Sci. Policy for the 21st Cent., Melbourne, Australia, p. 51-94. 1996.

PINGALI, P. & PANDEY, S. (2001) World maize needs meeting: Technological opportunities and priorities for the public sector. In: CIMMYT 1999-2000 World maize facts and trends. Meeting world

maize needs: Technological opportunities and priorities for the public sector. P.L. Pingali (Ed), pp 7-10. CIMMYT, Mexico.

PINTO, N.F.J. Tratamento com fungicidas de sementes de milho. In: SOAVE, J., OLIVEIRA, M.R.M.; MENTEN, J.O.M. (ed.) Tratamento químico de sementes. Campinas: Fundação Cargil, 1996. p. 52-57

PINTO, N.F.J.de A. Eficiência de fungicidas no controle de doenças foliares de milho. Summa Phytopathologica, v.23,p.271-274, 1997.

POZZA, E. A.; SOUZA, P. E.; CASTRO, H. A. & POZZA, A. A. A. Frequência da ocorrência de doenças da parte aérea de plantas na região de Lavras - MG. Ciência e agrotecnologia, Lavras, v. 23, n. 4, p. 1001-1005, 1999.

QUEZADO-SOARES, A.M. & LOPES, C.A. Produção de grãos de milho-pipoca sob diferentes níveis de infecção por *Exserohilum turcicum*. Fitopatologia Brasileira. 18:506-511, 1993.

RAMDUTTA, MEENA-SHEKHAR & SANGAMLAL. Evaluation of maize genotypes for locating sources of resistance to *Exserohilum turcicum* incitant of turcicum leaf blight of maize. Indian Phytopathology, 58: 67-70. 2005.

RAMATHANI, I.; BIRUMA, M.; MARTIN, T.; DIXELIUS, C. & OKORI, P. Disease severity, incidence and races of *Setosphaeria turcica* on sorghum in Uganda. Eur. J. Plant Pathol. DOI: 10.1007/s10658-011-9815-1. 2011

RAHMAN, M.A.; BEGUM, L.A.; ALAM, K.B. & KHAN, A.L. Efficacy of fungicides to control turcicum leaf blight of maize. Bangladesh Journal of Plant Pathology, 9: 35-36.1993.

RAYMUNDO, A.D. & HOOKER, A.L. Measuring the relationship between northern corn blight and yield losses. Plant Disease 65:325-327. 1981.

REEVES, R.G. & MANGELSDORF, P.C.A proposed taxonomic change in the tribe Maydeae. Am. J. Bot., 29: 815-817. 1942.

REIS, E. M.; CASA, R. T.; SEGALIN, M.; DEUNER, E. & CARMONA, M. Estratégias para a produção de material de propagação vegetal livre de patógenos. Informativo Abrates, v. 19, p. 19-36, 2009

REIS, E. M.; REIS, A. C. & CARMONA, M. A. Manual de fungicidas - Guia para o Controle Químico de Doenças de plantas. 6 ed. Passo Fundo: Editora UPF, 2010. 226 p.

REIS, E.M. & CASA, R.T. Manual de identificação e de controle de doenças do milho. Passo Fundo. Aldeia Norte Editora, 1996. 80p.

REIS, E.M. Selective medium for isolating *Cochliobolus sativus* from soil. Plant Disease 67:68-70. 1983.

REIS, E.M.; CASA, R.T. & BRESOLIN, A.C. Manual de diagnose e controle de doenças do milho. 2ed. rev. atual. Lages: Graphel, 2004.144p.

REIS, E.M.; CASA, R.T. & MEDEIROS, C.A. Diagnose, patometria e controle de doenças dos cereais de inverno, ES Comunicação S/C Ltda. Londrina, PR. 2001. 94p.

RICHARDSON, M. J. An Annotated List of Seed-Borne Diseases. 4th ed. International Seed Testing Association, Zurich, Switzerland. 1990.

RITCHIE, S.W.; HANWAY, J.J. & BENSON, G.O. How a corn plant develops. Ames: Iowa State University of Science and Technology. 26p. Special Report, 48. 1993.

ROBERT, A.L. Pl. Dis. Repr. 46:321, 1962. In: FERNANDEZ VALIELA, M.V. Introducción a la fitopatología. Buenos Aires, Gadala, 1952.

ROBERTS, T. & HUTSON, D. Metabolic pathways of agrochemicals. Part two, insecticides and fungicides. The Royal society of chemistry. 1999.

ROBESON, D. & STROBEL, G. Monocerin, a phytotoxin from *Exserohilum turcicum* (= *Drechslera turcica*). Agric. Biol. Chem. 46, 2681-2683, 1982.

RUSSEL, P.E. Sensitivity baselines in fungicide resistance research and management. FRAC Monograph nº3, Cambridge CB2 4AN, UK, 2004.

RUSSEL, P.E. Taking the path of least resistance – what resistance is, why it is a problem and what we can do to combat it. Pesticide Outlook, v.14, part 2, p.57-61, 2003.

SALISBURY, F.B. & ROSS, C.W. Plant physiology. 4.ed. Belmont: Wadsworth, 1991. 682p.

SANTOS, A. C. K. S. *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro: Detecção, inoculação artificial e controle químico. 1995. 68 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo, Piracicaba.

SHARMA, J.P. & MISHRA, B. Effect of spray schedule of mancozeb on turcicum leaf blight and impact on grain yield in maize. Indian Journal of Plant Protection, 16:189-193. 1988.

SHARMA, R.C., RAI, S.N. & BATSA, B.K. Identifying resistance to banded leaf and sheath blight of maize. Indian Phytopathology, 58: 121-122. 2005.

SHIVANKAR, S.K. & SHIVANKAR, R.S. Losses in grain yield due to turcicum leaf blight disease in maize. Agricultural Science Digest, 20: 201-202, 2000.

SHOEMAKER, R.A. Nomenclature of *Drechslera* and *Bipolaris* grass parasites segregated from "*Helminthosporium*". Canadian Journal Botany 37:879-887, 1959.

SHURTLEFF, M.C. Compendium of corn disease. First Edition. The American Phytopathology. 1973. 105p.

SHURTLEFF, M.C. Compendium of corn diseases. American Phytopathological Society, 1992. 105p.

SHREE, M.P. & LUKE, P. Inability of *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leo. Ex Sug., to survive as a saprophytic in soil in-situ. Plant and Soil, 74: 141-144. 1983.

SINGH, R.D.N. & KAISER, S.A. Seed treatment with bavistin and vitavax on the incidence of turcicum leaf blight of maize at pre-tassel stage. Indian Journal of Mycological Research, 27: 31-35. 1989.

SIVANESAN, A. Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. Mycological Papers, n° 158, Kew, I.M.I. C.A.B. 1987.

SOARES, A.M.Q.; FONSECA, M.E.N. & LOPES, C.A. Caracterização cultural, grupos de compatibilidade e padrões isoenzimáticos de isolados de *Exserohilum turcicum* obtidos de milho (*Zea mays*). Fitopatol. Brás. 18:219-225. 1993.

SMITH, B.D. The emergence of agriculture. Scientific American Library, New York, 1995.

STANGARLIN, J.R. & PASCHOLATI, S.F. Proteção de plântulas de milho pipoca contra *Exserohilum turcicum* pelo uso de *Saccharomyces cerevisiae*. Summa Phytopathologica, v.20, p. 16-21, 1994.

TANAKA, M.A.S. & MENTEN, J.O.M. Comparação de métodos de inoculação de sementes de algodoeiro com *Colletotrichum gossipii* var. *cephalosporioides* e *C. gossipii*. Summa Phytopathologica, v.17, p. 218-226, 1991.

THAKUR, R.P.; LEONARD, K.J. & LEATH, S. Effects of temperature and light on virulence of *Exserohilum turcicum* on corn. Phytopathology. St. Paul, v.79, p.631-635, 1989.

TAKEN, J.P.; ADIPALS, L. & OGENGA-LATIGO, M.W. Northern leaf blight progress and spread from infested maize residue. African Crop Sciences Journal, 2: 197-205. 1994.

TSAO, P.H. Selective media for isolation of pathogenic fungi. Annual Review of Phytopathology. Vol. 8: 157-186, 1970.

TUITE, J. Media and nutrient solutions. In: TUIE, J. ed. Plant pathological methods. Mineapolis: Burgess Publishing. 239p. 1969.

TURNER, M.T. & JOHNSON, E.R. Race of *Helminthosporium turcicum* not controlled by Ht genetic resistance in corn in the American corn belt. Plant Disease, St. Paul, MN, 64:216-217, 1980.

ULLSTRUP, A.J. A comparison of monogenic and polygenic resistance to *Helminthosporium turcicum* in corn, Phytopathology 60:1597-1599, 1970.

ULLSTRUP, A.J. Corn diseases in the United States and their control. Agriculture Handbook N°. 199, United States, Department of Agriculture, p. 26, 1966.

ULLSTRUP, A.J. Corn diseases in the United States and their control. Washington: USDA/Agriculture Research Service, p.56, 1974.

ULLSTRUP, A.J. Observations on two ephiphytotics of *Diplodia* ear rot of corn in Indiana. Plant Disease 48:414-415. 1964.

ULLSTRUP, A.J. Sources of resistance to northern corn leaf blight. Plant Dis. Rep. 47:107-108, 1963.

ULLSTRUP, A.J. Two physiologic races of *Helminthosporium maydis* in the corn belt. Phytopathology 31:508-521. 1941.

USDA-FAS. United States Departament of Agriculture. Foreign Agricultural Services. <http://www.fas.usda.gov>. 2012

VITTI, A.J.; BERGAMIN FILHO, A. & AMORIM, L. Epidemiologia comparativa entre ferrugem comum e a helmintosporiose do milho. Fitopatologia Brasileira 18:314. 1993.

VITTI, A.J.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. & FEGIES, N. C. Epidemiologia comparativa entre ferrugem comum e a helmintosporiose do milho. I: Efeito de variáveis climáticas sobre os parâmetros monocíclicos. Summa Phytopathologica, Jaguariúna, v.21, p127-130, 1995.

WARHAM, E.; BUTLER, L.D. & SUTTON, B.C. Seed Testing of Maize and Wheat. A Laboratory Guide. Sustainable Maize and Wheat Systems for the Poor. International Maize and Wheat Improvement Center CIMMYT. Mexico. D.F. Mexico. ISBN: 968-6923-70-5, 2002.

WELZ, H.G. & GEIGER, G.G. Virulence variation in *Setosphaeria turcica* populations collected from maize in China, Mexico, Uganda and Zambia. Phytopathology, St. Paul, MN, 83: 1356, 1993.

WEATHERWAX, P. History and origin of corn. I. Early history of corn and theories as to its origin. In G.F. Sprague, ed. Corn and corn improvement, 1st ed., p. 1-16. New York, NY, USA, Academic Press. 1955.

WHITE, D.G. Compendium of corn diseases. Third edition. The American Phytopathological Society, APS Press, St Paul, Minnesota, USA. 1999. 78 p.

WILKES, H.G. Mexico and Central America as a centre for the origin of agriculture and the evolution of maize. Crop Improv., 6(1): 1-18. 1979.

WILKES, H.G. Teosinte: the closest relative of maize revisited. Maydica, 30: 209-223. 1985.

WILKES, H.G. Maize: domestication, racial evolution and spread. In D.R. Harris & G.C. Hillman, eds. Forage and farming, p. 440-454. London, Unwin Hyman. 1989.

WILKES, H.G. & GOODMAN, M.M. Mystery and missing links: the origin of maize. In S. Taba, ed. Maize genetic resources, p. 1-6. Mexico, DF, CIMMYT. 1995.

WINDES, J.M. & PEDERSEN, W.L. An isolate of *Exerohilum turcicum* virulent on maize inbreds with resistance gene HtN. Plant Dis. 75: 430, 1991.

WIESE, M.V. Compendium of wheat diseases. American Phytopathological Society, 1977. 106p.

ZADOKS, J.C. & SCHEIN, R.D. Epidemiology and plant disease management. New York, Oxford University Press. 1969. 427p.

ZAMBOLIM, L. Importância do tratamento de sementes no manejo integrado de doenças. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 8., 2004, João Pessoa, Palestras e resumos. João Pessoa: Tropical Hotel Tambú, 2004. p. 94-100.

ZAMBOLIM, L.; CASA, R.T. & REIS, E.M. Sistema plantio direto e doenças em plantas. Fitopatologia Brasileira 25:585-595. 2000

ZANG, L.; DONG, J.; WANG, C. & LI, Z-P. Purification and structional analysis of a selective toxin fraction produced by the plant pathogen *Setosphaeria turcica*. Agricultural Sciences in China, 6, 452-457, 2007.